

Differenzierungsabhängige Bildung von Östrogenmetaboliten durch die Monozytenzelllinie U-937

**Dissertation
zum Erlangen des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der
Friedrich- Schiller- Universität Jena**

von **Volker Fritsch**

geboren am 30.November 1980 in Werdau/ Sachsen

12.03.2012

Gutachter 1: Prof. Dr. med. Reinhard Klinger, Jena

Gutachter 2: PD Dr. med. Peter Oelzner, Jena

Gutachter 3: Prof. Dr. med. Rainer H. Straub, Regensburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2012

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1 Die Rheumatoide Arthritis – Charakteristika	10
2.2 Therapiekonzepte	10
2.3 Epidemiologie.....	12
2.4 Einfluss der Sexualhormone	14
2.4.1 Stoffwechsel der Steroidhormone.....	14
2.4.2 Androgene.....	16
2.4.3 Östrogene.....	18
2.5 Östrogenmetaboliten.....	19
2.5.1 Hydroxyöstrogene	19
2.5.2 Methoxyöstrogene	20
2.6 Immunzellen im Gelenk.....	22
3. ZIELE DER ARBEIT.....	23
4. MATERIAL UND METHODEN.....	24
4.1 Zellkultur	24
4.1.1 Medien und Lösungen	24
4.1.2 Kultivierung der U-937 Zellen	25
4.2 Radio-HPLC-Analyse von Östrogen-Metaboliten.....	29
4.2.1 Extraktion der Östrogen-Metaboliten.....	29
4.2.2 Probenvorbereitung für die Radio-HPLC-Analyse	30
4.2.3 Radio-HPLC-Analyse von Östrogen-Metaboliten	31
4.3 Nachweis der Expression der Catechol-O-Methyltransferase.....	34
4.3.1 Zellkultur	34
4.3.2 RNA-Isolierung	34
4.3.3 Erzeugung von cDNA.....	34
4.3.4 PCR-Amplifikation von Catechol-O-Methyltransferase- und β -Actin-Fragmenten	35
4.3.5 Analyse der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese.....	36
5. ERGEBNISSE	37
5.1 Die U-937 Monozyten haben eine überwiegend reduzierende Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase.....	37

5.2 Die Bildung von Hydroxyöstrogenen nimmt bei der Differenzierung von U-937 Zellen zu Makrophagen ab.....	38
5.3 Die Catechol-O-Methyltransferase ist für die Bildung von Methoxyöstrogenen durch U-937 Zellen verantwortlich.....	40
5.3.1 Die Konversion zu Methoxyöstrogenen ist bei den U-937 Makrophagen reduziert	40
5.3.2 Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase führt zu verringerter Bildung von Methoxyöstrogenen	41
5.3.3 Nachweis der Catechol-O-Methyltransferase-mRNA	42
5.4 Untersuchungen zur Regulation.....	44
5.4.1 Phorbol 12-myristat 13-acetat und die Anwesenheit von Serum regulieren die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen von U-937 Makrophagen bzw. Monozyten.....	44
5.4.2 Serum bewirkt eine Hemmung der 16 α -Hydroxylierung von Östron.....	46
6. DISKUSSION	47
6.1 Das experimentelle System und die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	47
6.2 Produzierte Östrogenmetaboliten.....	48
6.3 Makrophagen verlieren die Fähigkeit zur Synthese antiinflammatorischer Östrogenmetaboliten.....	49
6.4 Die Rolle der Catechol-O-Methyltransferase (COMT).....	51
6.5 Die Rolle der Monozyten bzw. Makrophagen im System der Entzündungszellen bei der Rheumatoiden Arthritis.....	52
6.5.1 Gemischte Synoviozytenpräparationen	52
6.5.2 Fibroblasten wirken entzündungsfördernd.....	53
6.5.3 Monozyten wirken entzündungshemmend	53
6.5.4 Die Rolle der Makrophagen.....	54
7. SCHLUSSFOLGERUNGEN.....	56
8. LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS	58
9. ANHANG.....	64
9.1 Danksagung	64
9.2 Ehrenwörtliche Erklärung	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2OH-E1/E2	2-Hydroxy-Östron, bzw. Östradiol
2MeO-E1/E2	2-Methoxy-Östron, bzw. Östradiol
4OH-E1/E2	4-Hydroxy-Östron, bzw. Östradiol
4MeO-E1/E2	4-Methoxy-Östron, bzw. Östradiol
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
7 α OH-DHEA	7 α -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron
16 α OH-E1	16 α -Hydroxy-Östron
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Peptid-/Protein-Antigene (entspricht den Antikörpern gegen cyclische citrullinierte Proteine, CCP-AK)
ACR	American College of Rheumatology
AROM	Aromatase
Asc	Ascorbinsäure
ASD	Androstendion
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP-AK	Antikörpern gegen cyclische citrullinierte Proteine
cDNA	complementary DNA (rekombinante DNS)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Abkürzung für Cytochrom-P450 Enzyme
Δ 5-ADIOL	Δ 5-Androstendiol
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMARD	Disease-modifying anti-rheumatic drug
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dpm	disintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EA	Ethylacetat
EULAR	European League Against Rheumatism

FKS	Fetales Kälberserum
HPLC	High performance liquid chromatography/ Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
MB-COMT	Membrangebundene COMT (membrane-bound COMT)
MeCN	Acetonitril
MeO-E	Methoxyöstrogene
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NNR	Nebennierenrinde
NOAR	Norfolk Arthritis Register
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Arthrose (Osteoarthrosis)
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI - Medium	Rose Park Memorial Institute Medium
S-COMT	Lösliche Form der COMT (soluble form of COMT)
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
STS	Steroid Sulfatase
SULT1A1	Sulfotransferase 1A1
T	Testosteron
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TNF- β	Tumornekrosefaktor- β (Lymphotoxin)

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weit verbreitete, chronisch entzündliche Gelenkserkrankung mit Schwellungen und Schmerzen in mehreren Gelenken. Unbehandelt kann sie zur Zerstörung der betroffenen Gelenke führen. Zur Diagnosestellung und Abgrenzung von der Osteoarthritis (OA) dienen die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) und der europäischen Liga gegen Rheumatismus (European League Against Rheumatism, EULAR). Der autoimmune Charakter der RA spiegelt sich in der Wirksamkeit antientzündlicher Therapien (Glucocortikoide, Zytokinantagonisten) wieder.

Die Mechanismen der Krankheitsentstehung sind dagegen noch nicht vollständig verstanden. Die Erkrankungshäufigkeit der RA steigt mit dem Alter stark an und ist vor allem bei jüngeren Frauen deutlich größer als bei Männern. Das legt eine Beteiligung geschlechtsspezifischer Hormone an der Ätiopathogenese der RA nahe. Tatsächlich sind niedrige Androgenkonzentrationen und lokal erhöhte Östrogenkonzentrationen mit entzündlichen Gelenkserkrankungen assoziiert. Die Rolle von Östrogenen bei entzündlichen Erkrankungen ist nicht einheitlich pro- oder antiinflammatorisch, was auf mögliche unterschiedliche Wirkungen ihrer Metaboliten zurückgeführt wird.

In unserer Arbeitsgruppe wurde unter anderem gezeigt, dass gemischte Synoviozytenpräparationen von OA bzw. RA Patienten gleichermaßen eine Reihe von antiinflammatorischen Östrogenmetaboliten bilden (4- und 2-hydroxylierte Östrogene bzw. 4- und 2-Methoxyöstrogene). Dabei bildeten RA Synoviozyten jedoch ca. viermal so viel proinflammatorisches 16 α OH-E1 wie OA Synoviozyten. Vor diesem Hintergrund war es Ziel der vorliegenden Arbeit, am Beispiel der Monozytenzelllinie U-937 herauszufinden, welche Rolle Monozyten und Makrophagen, die einen Teil der gemischten Synoviozytenpräparationen darstellen, bei der Synthese biologisch aktiver Östrogenmetaboliten spielen können.

Dazu wurden U-937 Monozyten bzw. aus diesen durch Phorbol esterbehandlung differenzierte Makrophagen mit 3H-markierten Östrogenen unter verschiedenen Bedingungen inkubiert, die Steroide isoliert und mit Hilfe der Radio-HPLC identifiziert und quantifiziert. Die Expression der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) wurde mittels RT-PCR untersucht.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass U-937 Monozyten alle antiinflammatorischen Östrogenmetaboliten (4- und 2-hydroxylierte Östrogene bzw. 4- und 2-Methoxy-östrogene) bilden können, die auch von gemischten Synoviozytenpräparationen gebildet werden. Die Fähigkeit zur Synthese dieser Östrogenmetaboliten nimmt bei Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark ab. Im Hinblick auf die Schlüsselrolle von Makrophagen im Entzündungsgeschehen bei der RA erscheint es durchaus plausibel, dass die Aktivität von Enzymen, die die Synthese antiinflammatorischer Metaboliten katalysieren, im Laufe der Differenzierung herunterreguliert wird. Andererseits könnte die Bildung antiinflammatorischer Östrogenmetaboliten durch Monozyten dazu dienen, eine vorzeitige/ zufällige Aktivierung dieser Zellen zu verhindern.

Interessanterweise ließ sich die Hypothese, Monozyten bzw. vor allem Makrophagen seien für die Synthese des proinflammatorischen $16\alpha\text{OH-E1}$ verantwortlich, nicht bestätigen. Das legt den Schluss nahe, dass hauptsächlich Fibroblasten, für die $16\alpha\text{OH-E1}$ Synthese schon gezeigt worden war, als Quelle dieses Metaboliten in Synovialgewebe in Frage kommen. Somit scheint zumindest in Bezug auf die entzündungsregulierende Wirkung von Östrogenmetaboliten die Rollenverteilung in gemischten Synoviozytenpräparationen geklärt zu sein: Monozyten produzieren antiinflammatorische, Fibroblasten proinflammatorische Metaboliten.

Durch Experimente mit dem COMT-spezifischen Inhibitor OR-486 wurde die COMT als für die Konversion von Catechol-, zu Methoxyöstrogenen verantwortliches Enzym identifiziert. Durch RT-PCR Experimente konnte die Expression der löslichen Form der COMT (S-COMT) nachgewiesen werden.

Für gemischte Synoviozytenpräparationen war bekannt, dass sowohl die Catecholöstrogene als auch ihre Methylierungsprodukte, die Methoxyöstrogene, hemmend auf die Freisetzung von TNF und anderen Zytokinen wirken. Daher kann nach dem jetzigen Kenntnisstand keine fundierte Aussage zur biologischen Bedeutung der COMT-vermittelten Synthese von Methoxyöstrogenen durch Monozyten bzw. Makrophagen gemacht werden.

Im Hinblick auf die weitere Aufklärung der Rolle von Östrogenen bzw. Östrogenmetaboliten in der Pathogenese der RA wäre es erforderlich, relevante Zelltypen und Mechanismen zu identifizieren, die in unterschiedlicher Weise von Hydroxy- bzw. Methoxyöstrogenen beeinflusst werden.

2. EINLEITUNG

2.1 Die Rheumatoide Arthritis – Charakteristika

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine weit verbreitete chronisch entzündliche Gelenkserkrankung mit dem Charakter einer Autoimmunkrankheit (Firestein 2003). Auch als chronische Polyarthritis bekannt, manifestiert sich die RA durch Schwellung und Schmerzen in mehreren Gelenken. Im Verlauf führt die Krankheit durch die Zerstörung der Gelenke zu einer unter Umständen ausgeprägten Behinderung. Als weitere Folge der RA gilt eine verfrühte Mortalität (Scott et al. 1987, Pincus et al. 1984, Isomaki 1992).

Bekannt sind verschiedene Arten der Pathogenese, die als Ursache einer Arthritis in Frage kommen. Unter anderem kann auch der degenerative Prozess der Arthrose (im engl. Osteoarthritis, OA), häufig durch mechanische Überlastung des Gelenkknorpels ausgelöst, eine entzündliche Komponente zeigen (Smith et al. 1997, Fiorito et al. 2005).

Um die RA klar von der OA abgrenzen zu können, wurden vom American College of Rheumatology (ACR) und der europäischen Liga gegen Rheumatismus (European League Against Rheumatism, EULAR) eindeutige Kriterien definiert (Aletaha et al. 2010).

2.2 Therapiekonzepte

Kaum eine andere Krankheit hat, auf Grund der umfangreichen Forschungserkenntnisse, eine so rasante Entwicklung im Therapiekonzept erlebt. Für eine wirksame Behandlung ist entscheidend, dass die Erkrankung so früh wie möglich erkannt und behandelt wird. Neben der Schmerzreduktion ist dabei das Hauptziel, das Voranschreiten der Knorpeldegeneration zu verlangsamen. Neben der physikalischen Therapie stehen verschiedene Optionen der medikamentösen Behandlung zur Verfügung.

Zur Schmerzlinderung werden Analgetika und zur Reduktion der Entzündungsreaktion nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) verwendet (FitzGerald 2003).

Sehr häufig wird das Basistherapeutikum Methotrexat (MTX) eingesetzt, das aufgrund von guter Wirksamkeit und akzeptabler Verträglichkeit nach wie vor als der "Goldstandard" gilt (Kay und Westhovens 2009). Weitere Basistherapeutika sind u. a. Goldverbindungen, Azathioprin, Sulfasalazin und Ciclosporin. Diese Medikamente werden meist als Dauertherapie verabreicht und sollen durch spezifische Wirkungen langfristig einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. Die Basistherapeutika werden auch als disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) bezeichnet. Häufig werden verschiedene Medikamentengruppen in Kombination eingesetzt. Kombiniert man die Basistherapeutika z.B. mit Glucocorticoiden, zeigen sich deutlich verbesserte Behandlungserfolge bei reduzierten Dosen der einzelnen Medikamente (Svensson et al. 2005).

Eine neuere Therapieoption sind die so genannten Biologika (im Englischen: Biologicals). Diese Stoffgruppe soll die Wirkung proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. die von Interleukinen oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) verhindern. Dabei kommen gentechnisch hergestellte Proteine zum Einsatz, die entweder die Entzündungsmediatoren neutralisieren oder die Aktivierung der entsprechenden Rezeptoren verhindern.

Um TNF- α als Hauptregulator der Entzündungsantwort vieler Organsysteme (Feldmann und Maini 2003) vor der Aktivierung des TNF-Rezeptors zu binden, werden unter anderem die monoklonalen Antikörper Adalimumab (Humira®, Abbott) und Infliximab (Remicade®, Centocor) eingesetzt. Als so genannte „Anti-TNF Antikörper“ sind Sie in der Lage, alle Formen des TNF- α (extrazellulär, rezeptorgebunden, transmembranär) zu neutralisieren. Die genannten Biologika werden zur Behandlung der Entzündungssymptome und zur Unterbindung des voranschreitenden Zerstörungsprozesses im Gelenk entweder als Monotherapie oder in Kombination mit MTX verabreicht.

In gleicher Weise wird auch Etanercept (Enbrel®, Wyeth) eingesetzt. Etanercept bindet nur die lösliche und die transmembranäre Form von TNF- α , aber auch TNF- β (Lymphotoxin) (Scallon et al. 2002).

Weiterer Ansatzpunkt der Biologika ist das IL-1 als wichtiger Regulator der Immunantwort. Anakinra (Kineret®, Amgen GmbH) inhibiert kompetitiv den IL-1 Rezeptor und blockiert so die proinflammatorische Wirkung von IL-1 (Fleischmann et al. 2006, So et al. 2007).

Bei Versagen der Kombinationstherapie mit TNF-Blockern kann MTX auch mit Rituximab (MabThera®, Roche) kombiniert werden. Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Zelloberflächenprotein CD20, das sich auf B-Zellen befindet. Damit ist Rituximab in der Lage, B-Zellen zu zerstören. Der Wirkstoff wird deshalb erfolgreich in der Behandlung von B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) eingesetzt (Scott 1998), zeigt sich aber in Kombination mit MTX auch als effektive Therapie bei Autoimmunerkrankungen wie der RA (Edwards et al. 2004).

2.3 Epidemiologie

Die Prävalenz der RA wird beim Menschen mit ca. 0,5-1% angegeben (Silman und Pearson 2002). Deutlich gesteigerte Prävalenzen zeigen sich nur bei einigen Gruppen der Ureinwohner Nordamerikas. Besonders niedrige Raten finden sich in Teilen von Asien und Südafrika (siehe dazu Abb. 1).

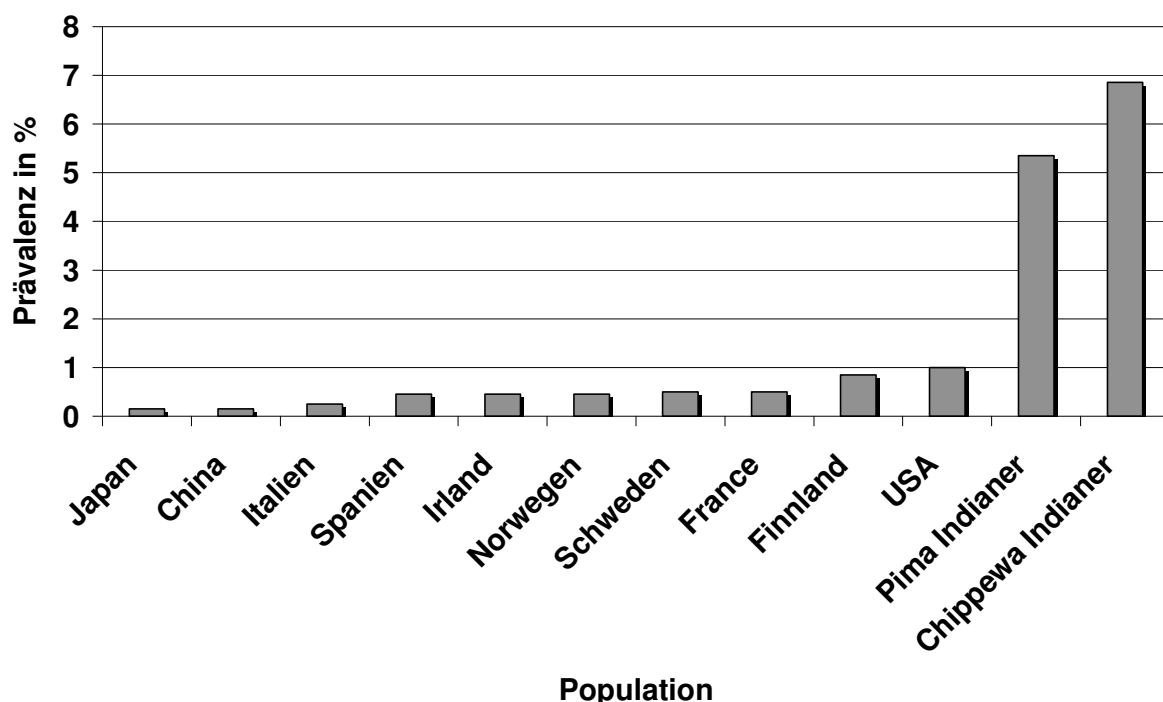


Abb. 1: Prävelenz der Rheumatoiden Arthritis in verschiedenen Populationen. Die Daten wurden der Arbeit von Silman und Pearson (Silman und Pearson 2002) entnommen.

Der häufigste Zeitpunkt für den Beginn der Erkrankung liegt zwischen dem 50. und dem 60. Lebensjahr. Nur ca. 19% der RA Erkrankungen treten vor dem 40. Lebensjahr auf (Zink et al. 2001).

Ein nachgewiesen erhöhtes Risiko für das Auftreten einer RA haben Träger bestimmter Allele des HLA-DRB1-Gens (HLA-DR1, HLA-DR4) (Zanelli et al. 2000), auch diverse andere Genloci sind mit der RA assoziiert (Morgan et al. 2010).

Auch das Geschlecht hat Einfluss auf das Erkrankungsrisiko. Die Prävalenz der RA in Europa wird im Gesamtdurchschnitt bei Männern mit 0,44%, bei Frauen mit 1,16% errechnet (Symmons et al. 2002). Das entspricht einem rund dreimal höheren Erkrankungsrisiko beim weiblichen Geschlecht.

Interessanterweise ändert sich die Geschlechtspräferenz der RA abhängig vom Alter stark. Die Verhältnis der Erkrankungshäufigkeit zwischen Frauen und Männern wird bis zum 60. Lebensjahr mit 4,4:1, im höheren Alter jedoch nur noch mit 1,6:1 (Bajocchi et al. 2000) angegeben.

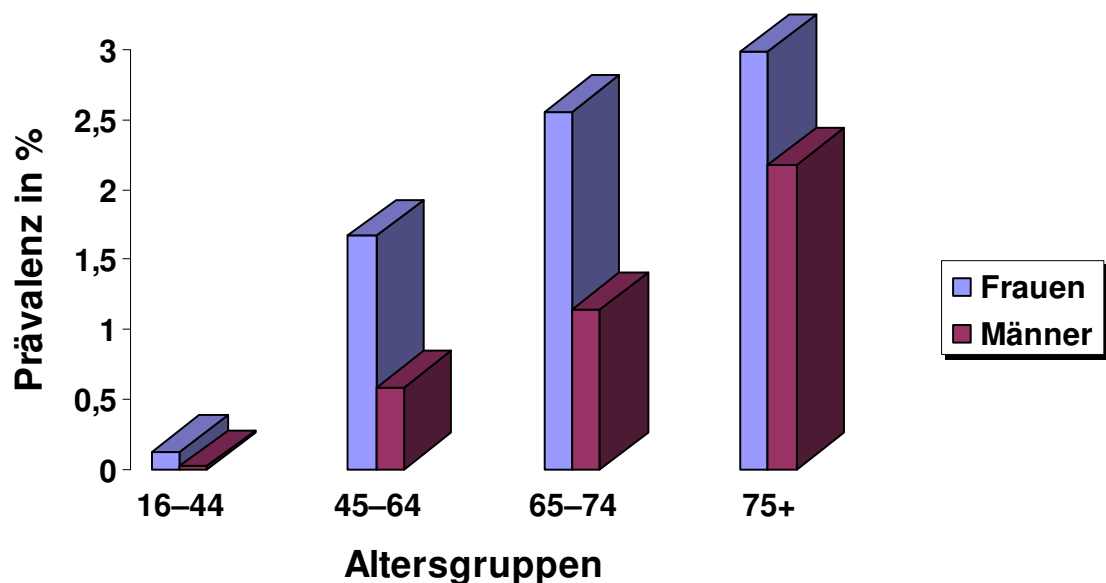


Abb. 2: Prävalenz der RA nach Alter und Geschlecht. Daten aus einer Erhebung des Norfolk Arthritis Register (NOAR), das sich auf die britische Bevölkerung bezieht (Symmons et al. 2002). Nach anfänglich großen Unterschieden, ist im höheren Lebensalter eine deutliche Konvergenz der RA- Prävalenzen beider Geschlechter zu erkennen.

In einer aktuellen Studie aus Großbritannien wurden entsprechende Daten für verschiedene Altersgruppen analysiert (Symmons et al. 2002): Bei den jüngeren Altersgruppen sind die Frauen ca. 2-4 Mal so häufig wie Männer von der RA betroffen, während in der Gruppe der über 75-Jährigen sich die Häufigkeiten stark angleichen. Deutlich wird in dieser Studie auch, dass die größte Zunahme der RA-Prävalenz bei den Frauen vor dem 45. Lebensjahr auftritt, bei den Männern aber ab

dem 75. Lebensjahr (dargestellt in Abb. 2). Vergleichsweise aktuelle Daten aus Deutschland, die nach ACR- bzw. EULAR- Kriterien erhoben wurden, sind nicht verfügbar. Eine auf Patientenbefragungen basierende Studie ergab für Deutschland eine vergleichbare Alters- und Geschlechtsabhängigkeit, jedoch insgesamt höhere Prävalenzen (Schneider et al. 2006).

Die geschlechtsspezifischen Verhältnisse der Prävalenzen der RA in Abhängigkeit vom Alter suggerieren einen Einfluss von Sexualhormonen auf die RA. Bei den Frauen fällt der starke Anstieg der Prävalenz in die Zeit nach der Menarche, nach der Menopause sinkt die Häufigkeit der Neuerkrankungen, während sie bei den Männern im höheren Alter steigt.

Aus diesen Beobachtungen ergeben sich eine Reihe von Fragen: Hängt die Prävalenz mit dem Vorhandensein von Östrogenen als Risikofaktor zusammen? Wirken Androgene protektiv? Oder trifft beides zu? Auf diese Fragen wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen.

2.4 Einfluss der Sexualhormone

Die Entzündungsprozesse der RA werden zu einem bedeutenden Teil von Steroidhormonen beeinflusst. Die Glucocorticoide werden auf Grund ihrer entzündungshemmenden Wirkung bereits seit langem erfolgreich in der Behandlung der RA eingesetzt (Buttgereit et al. 2004).

Für die folgenden Betrachtungen sind vor allem die Androgene und die Östrogene relevant, für die in den letzten Jahren eine Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen nachgewiesen wurde. Androgene wirken dabei antientzündlich, während Östrogene in der Literatur als eher entzündungsförderlich beschrieben sind (Straub et al. 1998, Cutolo et al. 2005). Tatsächlich könnte sich darin auch der ausgeprägte geschlechtsspezifische Unterschied bei den Erkrankungshäufigkeiten begründen.

2.4.1 Stoffwechsel der Steroidhormone

Ausgangsstoff für die Steroidsynthese ist das Cholesterol bzw. Cholesterin, ein Sterol, dass beim Menschen zu 90% im eigenen Körper synthetisiert und nur zu geringen Teilen über die Nahrung aufgenommen wird. Durch Hydroxylierung und

durch Abspaltung der Seitenketten des Cholesterols, katalysiert durch die Cholesterin-Monooxygenase (Cholesterin Seitenketten Spaltungsenzym, CYP11A), entsteht über das Zwischenprodukt Dihydroxycholesterol schließlich Pregnenolon. Dieses Prohormon kann von der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD) weiter in Progesteron konvertiert werden. Mit dieser Reaktion teilen sich die Wege der Steroidsynthese in die Untergruppen der Corticosteroide - Mineralocorticoide (Hauptvertreter Aldosteron) bzw. Glucocorticoide (Hauptvertreter Cortisol) - sowie der Androgene (Hauptvertreter Testosteron) und der Östrogene (Rainey und Nakamura 2008, Miller 2008).

Progesteron dient als Ausgangsstoff für die Synthese der Mineralocorticoide und der Glucocorticoide. Pregnenolon wird von der Steroid-17 α -Hydroxylase (CYP17A1) zu 17-OH-Pregnenolon und schließlich weiter zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) konvertiert, dem Vorläufer der männlichen wie auch der weiblichen Sexualhormone (Miller 2008).

Beim Mann ausschließlich in der Zona reticularis der Nebennierenrinde (NNR), bei der Frau zusätzlich zu ca. 1/3 in den Ovarien produziert, ist DHEA das am häufigsten vorkommende Steroidhormon des Körpers. Durch das Enzym Hydroxysteroid-Sulfotransferase (SULT2A1) erfolgt die Konjugation von DHEA zu seinem Sulfatester Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S), das als Prohormon keine androgene Aktivität aufweist. Die Serumkonzentration von DHEA-S beträgt ca. das 500-fache von DHEA, es liegen also nur ca. 0.2% des gesamten DHEA-S als biologisch aktives DHEA vor. Die Hydrolyse von DHEA-S zu DHEA erfolgt durch die Steroid Sulfatase (STS) (Hennebold und Daynes 1994, Yen et al. 1987).

Durch die 3β -HSD wird DHEA zuerst in das biologisch aktive Androgen 4-Androstendion konvertiert, das im Anschluss durch die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 3 (Testosteron- 17β -Dehydrogenase) zu Testosteron umgesetzt werden kann.

Im Rahmen der Östrogensynthese katalysiert die Aromatase (CYP19A1) die Reaktion von Testosteron zum biologisch aktiven Östradiol (E2) und von Androstendion zum biologisch inaktiven Östron (E1) (Aromatisierung). Über die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17β -HSD) ist dann sowohl die Oxidation von E2 zu E1 als auch die Reduktion von E1 zu E2 steuerbar.

Die Reaktionen der Cytochrom P450-Enzyme (CYP) sind irreversibel, während Reaktionen der Dehydrogenasen (HSD) reversibel sind. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 3.

Für die Ausscheidung der lipophilen Steroidhormone ist zuerst die Konversion in inaktive Sulfate bzw. die Glucuronidierung in der Leber notwendig. Die dabei entstehenden wasserlöslichen Substanzen können dann über Leber oder Nieren ausgeschieden werden (Lundgren et al. 1991).

2.4.2 Androgene

Wie bei den Glucocorticoiden besteht bei RA-Patienten auch bei den Androgenen ein Mangel, wenn die Serumkonzentrationen als Maß verwendet werden (Straub und Cutolo 2001). Die bereits erwähnte antiinflammatorische Wirkung von männlichen Sexualhormonen wie Testosteron, DHEA oder Androstendion beruht u. a. auf der Hemmung der Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF (Danenberg et al. 1992, Daynes et al. 1993, Li et al. 1993, Cutolo et al. 1995, Kanda et al. 1996, Kanda et al. 1997, Straub et al. 1998). 5 α -Dihydrotestosteron wirkt nachweislich supprimierend auf die T-Zell Proliferation (Toyoda et al. 1996).

Der antientzündliche Einfluss der Androgene ist eine mögliche Erklärung, warum sich im zunehmenden Alter die RA-Prävalenz beider Geschlechter so stark annähert (s. Abb.2). Im männlichen Hormonhaushalt kommt es zur Verringerung des Anteils der Androgene, der Mann verliert damit im Alter die protektive Wirkung der Androgene (Masi 1995).

Klinisch konnte bereits sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen RA-Patienten der positive Einfluss einer Substitutionstherapie mit Androgenen bestätigt werden (Booji et al. 1996, Cutolo et al. 1991). Allerdings stehen die bei diesen Studien beobachteten Nebenwirkungen einer generellen Anwendung entgegen.

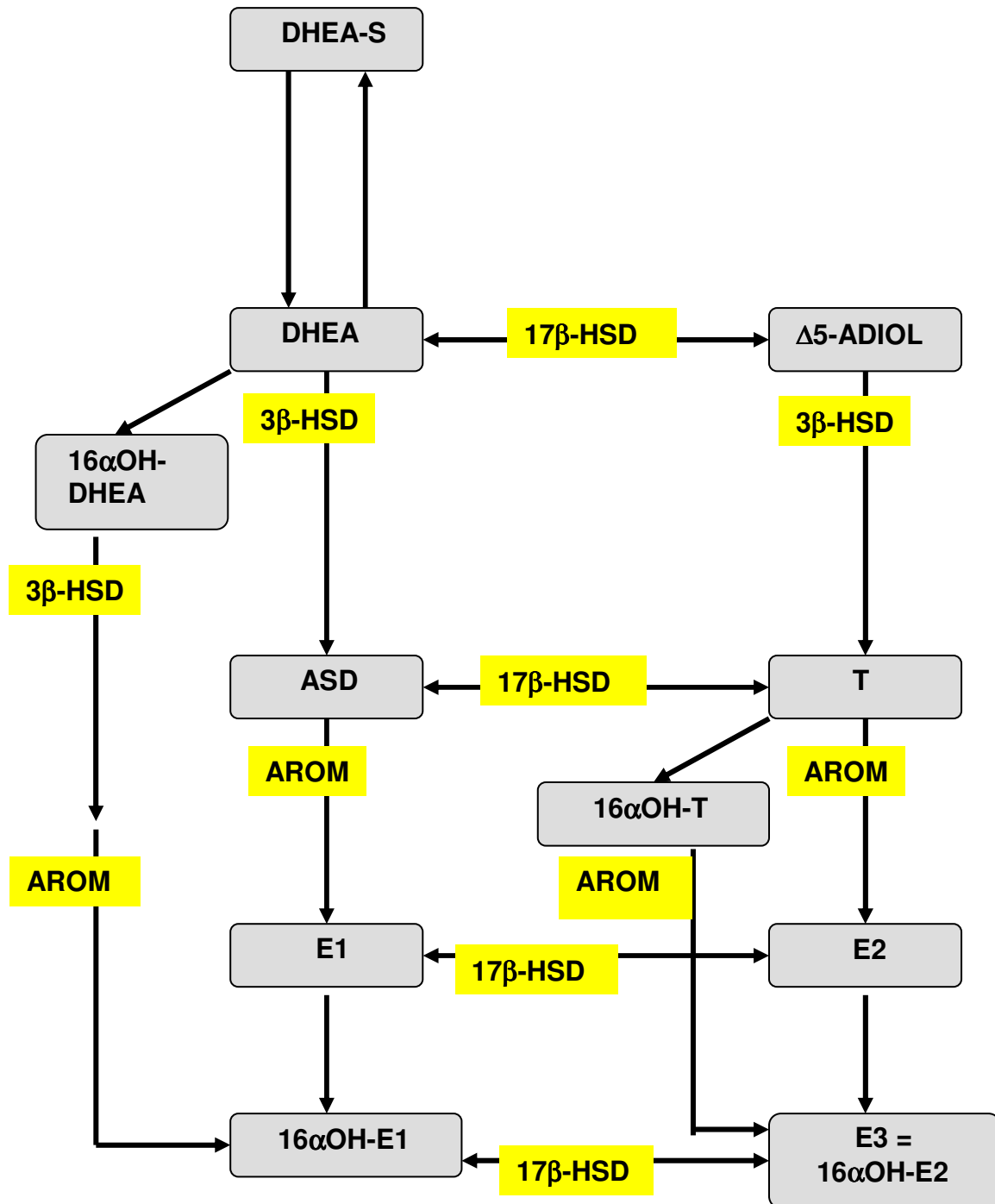


Abb. 3: Synthese der Sexualhormone. Dargestellt sind die in der Blutbahn zirkulierenden Edukte DHEA und DHEA-S, die über Sulfatase und Sulfotransferase in Beziehung stehen, sowie die weiteren Synthesewege vom Prohormon DHEA zu den nachfolgenden Androgenen und Östrogenen. Durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) wird die Reaktion von DHEA zu Androstendion (ASD) und von Δ^5 -Androstendiol (Δ^5 -ADIOL) zu Testosteron (T) katalysiert. ASD und T werden durch die Aromatase (AROM) weiter zu Östron (E1) und Östradiol (E2) verstoffwechselt, die durch eine 16 α -Hydroxylase dann z.B. zu 16 α -Hydroxy-Östron (16 α OH-E1) und 16 α -Hydroxy-Östradiol (16 α OH-E2), also Östriol (E3), konvertiert werden können. Die verschiedenen Isoenzyme der Familie der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (17 β -HSD) katalysieren die reversible Reduktion/ Oxidation der 17-Keto-/ 17-Hydroxy-Gruppe.

2.4.3 Östrogene

Auch die Östrogene haben einen bedeutenden Einfluss auf die Immunantwort (Cutolo und Wilder 2000). Es zeigte sich, dass Antiöstrogene in der Synovialflüssigkeit antiinflammatorisch wirken, in dem sie die Differenzierung von Makrophagen zu dendritischen Zellen hemmen und die T-Zell-Stimulation behindern (Komi et al. 2001).

Die Wirkung der Östrogene wird aber nicht nur als pro- sondern auch als antiinflammatorisch beschrieben. Konzentrationsabhängig können gegensätzliche Effekte auftreten. Die Wirkung von E2 auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF durch Zellen in vitro variiert abhängig von der E2 Konzentration stark. Während 10^{-6} M (= 280 ng/ml) E2 die Zytokinproduktion hemmen, bewirkt es bei einer Konzentrationen von 10^{-9} M (= 0.28 ng/ml) eine gesteigerte Produktion (Hu et al. 1988, Polan et al. 1990, Correale et al. 1998).

Zusammengenommen sind die Effekte der Östrogene auf entzündliche Prozesse nicht einheitlich (im Gegensatz zu den Glucocorticoiden bzw. Androgenen). Als mögliche Erklärung hierfür werden u. a. Unterschiede im Metabolismus der Östrogene (siehe 2.5) und eine Reihe anderer gewebespezifischer Ursachen diskutiert (Straub 2007).

Über spezifische Wirkungen von Östrogenen auf Zellpopulationen in von RA betroffenen Gelenken ist derzeit noch wenig bekannt. Da fast alle relevanten Zelltypen Östrogenrezeptoren exprimieren, kann davon ausgegangen werden, dass klassische Östrogenwirkungen wie Mitosestimulation bzw. Hemmung der Apoptose eine Rolle spielen, zumindest in Monozyten bzw. Makrophagen (Cutolo et al. 2005). Am Modell von Chondrozytenaggregaten, die aus mesenchymalen Stammzellen erzeugt wurden, wurde gezeigt, dass Östradiol die Bildung extrazellulärer Matrixkomponenten hemmt (Jenei-Lanzl et al. 2010). Interessanterweise sind die Östrogenkonzentrationen in der Synovialflüssigkeit (Castagnetta et al. 2003) bzw. Gewebeexplantaten von RA-Patienten (Schmidt et al. 2005a) dramatisch höher als im Blut, wobei die Ursachen dafür bisher nicht aufgeklärt sind.

Auch die anwesenden Immunzellen, deren spezifische Immunantworten und das lokale chemische Milieu haben vermutlich Einfluss auf die Wirkung der Östrogene. Auf die Rolle der Immunzellen wird in 2.6 näher eingegangen.

2.5 Östrogenmetaboliten

2.5.1 Hydroxyöstrogene

Bei den in Geweben wirksamen Steroiden handelt es sich nicht nur um die über die Blutbahn verfügbaren- im Fall der Östrogene also hauptsächlich Östron-Sulfat, Östron und Östradiol- sondern auch um lokal produzierte Metaboliten.

Im Rahmen von komplexen Reaktionen wirken spezifische Enzyme auf die Östrogene und katalysieren so deren weiteren Stoffwechselweg. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die dabei entstehenden biologisch aktiven Metabolite von Östron und Östradiol zu einem wesentlichen Teil für die Steuerung der entzündlichen Prozesse verantwortlich sind (Straub 2007, Schmidt et al. 2009).

Die Synthese dieser Metaboliten, vor allem Catechol- bzw. anderer Hydroxyöstrogene und Methoxyöstrogene, hängt von den im Gewebe exprimierten Enzymen ab.

Durch Enzyme der Cytochrom-P450 Gruppe können die Östrogene an nahezu allen Positionen oxidiert bzw. hydroxyliert werden. Wenn Hydroxylierungen an den Positionen 2 bzw. 4 des Östrangerüsts stattfinden, entstehen die Catecholöstrogene. Bei in vitro Versuchen mit menschlichen und tierischen Zellen wurde bisher die Bildung von mehr als 40 verschiedenen Metaboliten nachgewiesen (Zhu und Conney 1998). Am häufigsten werden dabei die Positionen 2, 4 und 16 hydroxyliert (siehe Abb. 4). Die entstehenden 2-, 4- und 16-Hydroxyöstrogene (2OH-E1, 2OH-E2, 4OH-E1, 4OH-E2 und 16 α OH-E1 bzw. 16 α OH-E2 = E3 (Östriol)) spielen eine beträchtliche Rolle in Entzündungsprozessen (Straub 2007).

Sowohl die 2- und 4-hydroxylierten Östrogene (2-/4OH-E1/E2), als auch die entsprechenden 2- und 4-Methoxyöstrogene (2-/4MeO-E1/E2) wurden als antiinflammatorisch beschrieben (Straub 2007, Dubey et al. 2005): unter anderem wurde ein direkter Zusammenhang der Anwesenheit von 2OH-E1 mit dem Voranschreiten der OA nachgewiesen (Sowers et al. 2006), eine Therapie mit 2MeO-E2 bewirkte im Mäusemodell sogar eine deutliche Abnahme der Arthritiszeichen, die Prevention von Neovaskularisationen und eine reduzierte Expression von IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-17 (Plum et al. 2009). In gemischten Synoviozytenpräparationen von RA- und OA-Patienten haben diese Metaboliten eine reduzierte Ausschüttung

des proinflammatorischen Zytokins TNF- α zur Folge, das in diesem System der wesentliche Entzündungsmediator ist (Schmidt et al. 2009).

Die 16 α -hydroxylierten Östrogene wurden bisher als entzündungsfördernd beschrieben (Straub 2007, Schmidt et al. 2005a, Bekhereva 1973, Liehr 1997, Iwamoto et al. 2010)). Im Gegensatz zu den anderen erwähnten Östrogenmetaboliten haben 16 α OH-E1 und 16 α OH-E2 als einzige keinen hemmenden Einfluss auf die TNF- α Produktion (Schmidt et al. 2009). Ob 16 α -hydroxylierte Östrogene durch Stimulation der TNF- α Produktion gar entzündungsfördernd wirken, konnte bislang nicht gezeigt werden, da die gemischten Synoviozytenpräparationen nicht vollständig von diesen Metaboliten befreit werden konnten. Dabei synthetisierten RA Synoviozyten im Vergleich mit OA Synoviozyten signifikant höhere Mengen an 16 α OH-Östron (16 α OH-E1) (rund das vierfache) (Schmidt et al. 2009). Im Gegensatz zu 16 α OH-E1 werden dem Östriol (16 α OH-E2 (= E3)) auch antientzündliche Eigenschaften zugeschrieben. Eine Therapie mit Östriol bewirkte signifikant antientzündliche Effekte mit teils sogar deutlicher klinischer Besserung der Krankheitssymptome bei Autoimmunkrankheiten wie der Multiplen Sklerose (Gold und Voskuhl 2009), auch der Rückgang von RA-Symptomen im Rahmen einer Schwangerschaft wird mit dem erhöhten Vorkommen von Östriol im Zusammenhang gesehen (Da Silva und Spector 1992).

2.5.2 Methoxyöstrogene

Die bereits erwähnten Methoxyöstrogene werden aus den Catecholöstrogenen (2-/4OH-E1/E2) (s. Abb.4), vermittelt durch die Aktivität der Catechol-O-Methyltransferase (COMT), gebildet. In Gegenwart von Magnesium wird eine Methylgruppe des Coenzym S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf eine der Hydroxylgruppen des Catecholöstrogens übertragen (Song et al. 2006).

Die COMT existiert in zwei gleich wirksamen Isoformen. Die S-COMT ist die lösliche Form, während die MB-COMT membrangebunden ist (Sharma und Dubey 2005, Bajaj et al. 2005). Außer im Gehirn, wo der Anteil der MB-COMT bis zu 70% betragen kann, liegt im menschlichen Körper vorrangig die S-COMT vor (Rossano et al. 2005).

Auch die durch die COMT gebildeten Methoxyöstrogene sind biologisch aktiv. In den meisten untersuchten experimentellen Systemen werden Wirkungen von

Hydroxyöstrogenen durch die entsprechenden Methoxyöstrogene antagonisiert (Straub 2007). Interessanterweise wurde bei humanen Synoviozyten nachgewiesen, dass in diesem Modellsystem für RA bzw. OA die 2-bzw. 4-Methoxymetaboliten des E2 genauso wie die zugehörigen Catecholöstrogene antiinflammatorisch wirken (Schmidt et al. 2009).

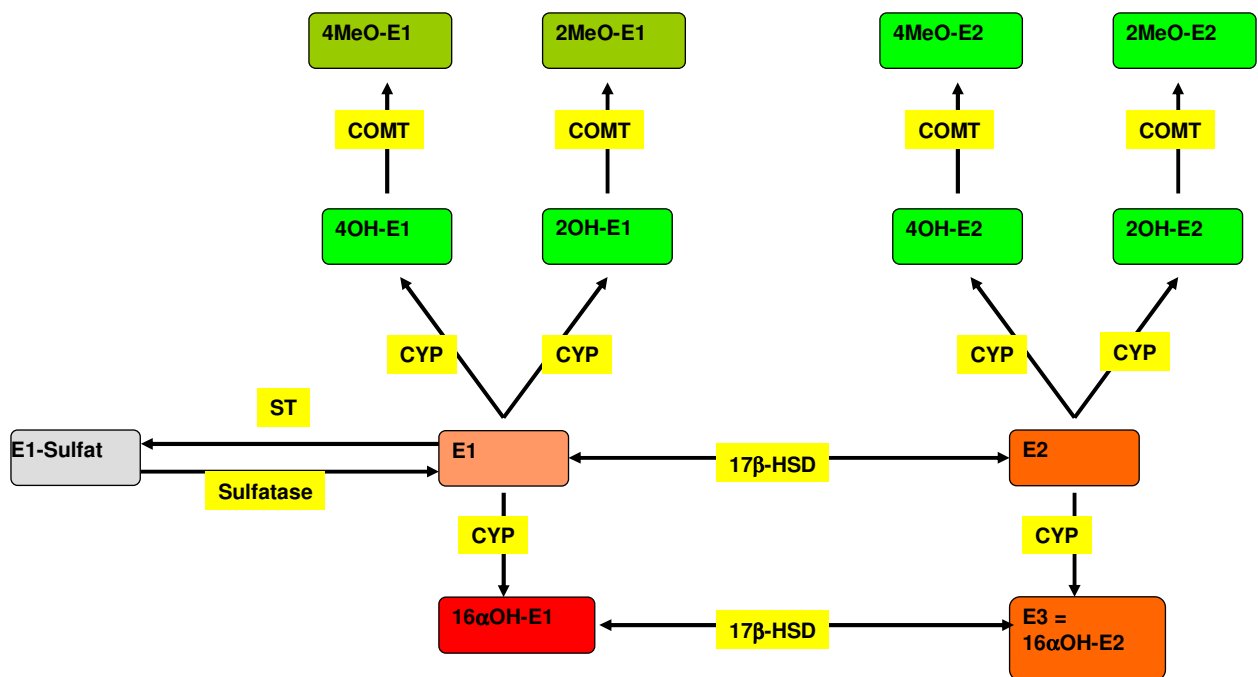


Abb. 4: Metabolismus der Östrogene. Die Verfügbarkeit von Östron (E1) bzw. Östradiol (E2) in Geweben wird durch deren Serumkonzentrationen und durch Konversion von Östronsulfat (E1-Sulfat) beeinflusst. Durch Sulfatase und Sulfotransferase (ST) steht Östron (E1) mit Östronsulfat (E1-Sulfat) im Gleichgewicht, über die 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17β-HSD) mit Östradiol (E2). Durch spezifische Enzyme der Cytochrom-P450 Familie (CYP) werden E1 und E2 an verschiedenen Positionen hydroxyliert. Durch Hydroxylierung an Position 2 bzw. 4 entstandene Catecholöstrogene können durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) weiter zu den entsprechenden Methoxy-Östrogenen konvertiert werden. Alle durch die CYPs und COMT katalysierten Reaktionen sind irreversibel.

2.6 Immunzellen im Gelenk

Die Wirkung der Sexualhormone und seiner Metaboliten ist in hohem Maße von den beteiligten Zellen abhängig. Eine Vielzahl der Immunzellen verfügt über funktionelle Rezeptoren für diese Hormone (Capellino et al. 2007).

Als entzündungsrelevante Zellen stehen die Makrophagen, die Monozyten und die Fibroblasten im Vordergrund. Allerdings sollten auch Chondrozyten bzw. Osteoblasten/ Osteoklasten als Steroid-empfindliche Zellen und auch als Steroid-metabolisierende Zellen berücksichtigt werden. In jüngerer Zeit wurde begonnen, den Zelltyp-spezifischen Steroid-Metabolismus im Synovialgewebe zu erforschen.

Die Makrophagen synthetisieren, durch die Aktivität von 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen, aus dem Prohormon DHEA Androgene. Deren potentielle antientzündliche Wirkung wird aber durch die Expression der Aromatase und damit die Bildung von Östrogenen relativiert (Schmidt et al. 2000).

Aus Synovialgewebe isolierte Fibroblasten hingegen synthetisieren mit Hilfe des Cytochrom P-450 Enzyms CYP7B den entzündungsfördernden DHEA Metaboliten 7α -Hydroxy-DHEA (7α OH-DHEA). Die Produktion des 7α OH-DHEA wird durch proinflammatorische Zytokine bis auf das zehnfache gesteigert, folglich findet sich dieser Metabolit deutlich erhöht in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten (Dulos et al. 2005, Dulos et al. 2004).

Während Dulos bei den Synovial-Fibroblasten keine 16α OH-E1-Bildung nachweisen konnte, wurde massive 16α OH-E1-Bildung durch Fibroblasten-artige Zellen gefunden, die aus Fettgewebe isoliert wurden, das ins Synovialgewebe von RA-Patienten infiltrierte (Schmidt et al. 2009).

3. ZIELE DER ARBEIT

Die Rolle des Steroidmetabolismus bei der OA und RA war in den letzten Jahren ein Kerngebiet der Forschung unserer Arbeitsgruppe. Da die dabei verwendeten gemischten Synoviozytenpräparationen sowohl pro- als auch antientzündliche Steroide synthetisieren, wurde begonnen, die Rolle einzelner Zelltypen beim lokalen Steroidmetabolismus aufzuklären. Zu diesem Zweck wurden die Fibroblasten, die Monozyten und die Makrophagen im Hinblick auf die Synthese biologisch aktiver Hormone untersucht.

Der spezifische Stoffwechsel von biologisch aktiven Östrogenmetaboliten, vor allem Hydroxy- und Methoxyöstrogene, ist in den oben genannten Zelltypen bis jetzt noch wenig erforscht. In der Synovialflüssigkeit von RA Patienten finden sich höhere Konzentrationen von 16 α OH-E1 und 4OH-E2 als bei Kontrollpersonen (Traumapatienten) (Castagnetta et al. 2003). Eine aktuelle Studie zur Östrogenkonversion im entzündlichen Synovialgewebe von RA- und OA-Patienten zeigte, dass gemischte Synoviozytenpräparationen beider Patientengruppen fähig sind, 16 α -, 4- und 2-hydroxylierte Östrogene bzw. auch 4- und 2-Methoxyöstrogene zu synthetisieren (Schmidt et al. 2009). RA-Synoviozyten produzieren dabei circa viermal so viel 16 α OH-E1 wie OA-Synoviozyten.

Vor diesem Hintergrund ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, am Beispiel einer monozytenartigen Modellzelllinie, U-937 (siehe auch 4.1.2) herauszufinden, welche Rolle Monozyten und Makrophagen bei der Synthese biologisch aktiver Östrogenmetaboliten spielen können. So soll letztlich die Rolle dieser Zelltypen im lokalen Steroidmetabolismus im entzündlichen Gewebe besser verstanden werden.

Dazu sollten:

- Die für die Analysen der Östrogenmetaboliten geeigneten Inkubations- und Extraktionsbedingungen optimiert werden
- Die von U-937 Monozyten bzw. Makrophagen produzierten Östrogenmetaboliten identifiziert und quantifiziert werden
- Hinweise auf die Regulation des Östrogenmetabolismus gewonnen werden
- Ein für den Östrogenmetabolismus in Monozyten bzw. Makrophagen wesentliches Enzym identifiziert werden

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Zellkultur

4.1.1 Medien und Lösungen

4.1.1.1 Medien

Aufzuchtmedium für die U-937 Stammpopulationen:

- 90 % RPMI 1640 mit Hepes und stabilem Glutamin (PAN Biotech, Aidenbach)
- 10 % fetales Kälberserum (PAA Laboratories, Cölbe)
- 40 µg Gentamycin / ml Medium (Ratiopharm)

Serumfreies Inkubationsmedium:

- RPMI 1640 mit Hepes und stabilem Glutamin (PAN Biotech, Aidenbach)
- 40 µg Gentamycin / ml Medium (Ratiopharm)
- 200 µM Ascorbinsäure als Oxidationsschutz

Einfriermedium:

- 95 % Aufzuchtmedium
- 5 % Dimethylsulfoxid

4.1.1.2 Östrogene

Die als Substrate für die Östrogenkonversionsexperimente eingesetzten radioaktiven Östrogene stammten von PerkinElmer NEN (Rodgau-Jügesheim) und waren in Ethanol gelöst. Je drei ml Kulturansatz wurden dabei eine Aktivität von 1 µCi (= 2220000 dpm) eingesetzt. Die Endkonzentrationen im Ansatz konnten dabei aus der spezifischen Aktivität berechnet werden.

- E1: [2,4,6,7-³H(N)]estrone,
spezifische Aktivität 3700000 MBq/mmol, Endkonzentration 3,33 nM
- E2: [2,4,6,7-³H(N)]estradiol,
spezifische Aktivität 3510000 MBq/mmol, Endkonzentration 3,51 nM

Als nicht radioaktive Östrogene wurden E1 und E2 von Steraloids (Newport, RI, USA) verwendet. Die Östrogene wurden in Ethanol absolut (99,9%) gelöst (10^{-4} M), um bei Zugabe von 1 μ l Östrogenstammlösung pro ml Medium eine Endkonzentration von 10^{-7} M zu erreichen.

4.1.1.3 Sonstige Lösungen

Lösungsmittel und Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt).

Als Medienzusätze wurden verwendet:

- Ascorbinsäure (Serva, Heidelberg): 200 mM Stammlösung in Ethanol
- Dexamethason (Sigma, Taufkirchen): 100 μ M Stammlösung in Ethanol
- OR-486 (Tocris Bioscience, Bristol, UK): in Konzentrationen von 1, 3 und 10 μ M.
- Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (Sigma, Taufkirchen): 25 μ M Stammlösung in Ethanol

PBS- Puffer, pH 7,2

- 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 150 mM NaCl

Trypanblaulösung

- 0,4 %(w/v) in PBS

4.1.2 Kultivierung der U-937 Zellen

Die folgenden Untersuchungen wurden ausnahmslos mit U-937 Zellen durchgeführt, einer Modell-Zelllinie humaner Monozyten. Die U-937 Zellen wurden 1974 von C. Sundstrom und K. Nilsson erstmals beschrieben, die Zelllinie stammt aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Patienten mit einem diffusen histiozytären Lymphom (Nilsson und Sundstrom 1974). Die U-937 Zellen sind ein etabliertes Standardmodell zum Studium des Wachstums, des Stoffwechselverhaltens und der Differenzierung monozytenartiger Zellen (Harris und Ralph 1985): Sie exprimieren, wie periphere

Blutmonozyten, geringe Mengen an F_c - und fMLP-Rezeptoren und setzen kleine Mengen an IL-1 bzw. H_2O_2 und Superoxid frei. Signale von T-Zellen bzw. eine mehrtägige Phorbolsterbehandlung führen zu einer massiven Steigerung dieser und vieler weiterer, für die Funktion reifer Makrophagen bedeutsamer, Moleküle. Deshalb wurden die U-937 Zellen für diese Arbeit als Monozytenmodell verwendet, durch dreitägige Phorbolsterbehandlung differenzierte U-937 Zellen als Makrophagenmodell – auch wenn diese Zelllinie nicht in allen Aspekten das Verhalten von Monozyten bzw. Makrophagen in vivo widerspiegelt.

4.1.2.1 Kryokonservierung und Auftauen

Zur Langzeitlagerung wurden exponentiell wachsende Zellen 5 Min bei 600 *g* zentrifugiert und anschließend in frisch zubereitetem Einfriermedium so resuspendiert, dass eine Konzentration von 1 Mio Zellen/ ml erhalten wurde. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und anschließend in einer Styroporbox über Nacht auf $-80^{\circ}C$ abgekühlt. Danach wurden die Röhrchen in einem Flüssigstickstofflagerbehälter überführt und bei $-190^{\circ}C$ gelagert.

Das Auftauen der gelagerten Zellen erfolgte durch Erwärmen der Kryoröhrchen im Wasserbad (ca. $37^{\circ}C$). Um das im Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid zu entfernen wurde die Zellsuspension bei 600*g* und $25^{\circ}C$ für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in auf ca. $37^{\circ}C$ vorgewärmtem Aufzuchtmedium resuspendiert, die Zellen anschließend in 75 cm² Kulturflaschen eingebracht.

4.1.2.2 Stammkultur

Die Stammkultur wurde in o.g. Aufzuchtmedium im Brutschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre aus 5% CO_2 in Luft bei $37^{\circ}C$ kultiviert. Eine regelmäßige Passage der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Bedingungen s. o.) und verdünnter Resuspendierung der Zellen in frischem Aufzuchtmedium. Generell wurde die Stammkultur mit 300000-500000 vitalen Zellen / ml inokuliert und bei ca. 2000000 Zellen / ml passagiert.

4.1.2.3 Bestimmungen von Zellzahl und Vitalität

Die Zellzählungen erfolgten in der Neubauer- Zählkammer am Mikroskop nach 1:1 Mischung der Zellsuspension mit Trypanblaulösung. Unter dem Mikroskop war auch die Vitalität der Zellen gut beurteilbar, vitale Zellen zeigten sich gleichmäßig gerundet und nahmen keinen Farbstoff auf. Als nicht vital wurden alle Zellen betrachtet, die innerhalb von 5 Min Farbstoff aufnahmen. Die Vitalität wurde berechnet als Zahl der vitalen Zellen durch Gesamtzellzahl.

Zur Bestimmung der Zellzahlen in Kulturen von U-937 Makrophagen wurden mikroskopische Aufnahmen (Vergrößerung 4x) dieser Kulturen angefertigt und auf diesen Aufnahmen definierte Flächen ausgezählt.

4.1.2.4 Differenzierung zu Makrophagen

U-937 Zellen können durch den Einfluss spezieller Stimulanzen differenziert werden und dadurch den Charakter reifer Makrophagen annehmen (Oberg und Eriksson 1991, Minto und Pambrun 1985, Pucillo et al. 1993). Zur Differenzierung von U-937 Zellen sind u. a. IFN- γ bzw. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) bekannt (Oberg et al. 1991). In der vorliegenden Arbeit wurde PMA verwendet.

Durch PMA differenzieren die monozytenartigen U-937 Zellen zu U-937 Makrophagen. Sie ändern dabei sichtbar ihre Morphologie und zeigen sich danach auf Grund von vermehrten Wechselwirkungen mit Oberflächen deutlich adhärent (Cabanas et al. 1990, Hattori et al. 1983, Jang et al. 2005, Boles et al. 2000). Bei Anwendung des nachfolgenden Differenzierungsprotokolls konnten diese morphologischen Veränderungen als Zeichen einer stattgefundenen Differenzierung der U-937 Zellen deutlich beobachtet werden (Abb. 5).

Um eine adäquate Zellzahl für die Inkubationsansätze mit U-937 Makrophagen zu erreichen, wurden zur Differenzierung U-937 Monozyten im Aufzuchtmedium in einer Konzentration von 1 Million Zellen / ml Medium in 6-Loch-Platten ausgesät (drei ml Zellsuspension pro Ansatz). Diese Zellkulturen wurden für jeweils 72 Stunden der stimulierenden Wirkung des PMA (Endkonzentration 8 nM) ausgesetzt. Danach wurde das PMA-haltige Medium verworfen, alle PMA haltigen Abfälle wurden in 1 M Kalilauge deaktiviert. Die nun am Boden der 6-Loch-Platten haftenden U-937 Makrophagen wurden zweimal mit auf 37°C vorgewärmtem serumfreiem Medium gespült. Dann erfolgte rasch die Zugabe von je 3 ml des endgültigen Inkubationsmediums pro Ansatz.

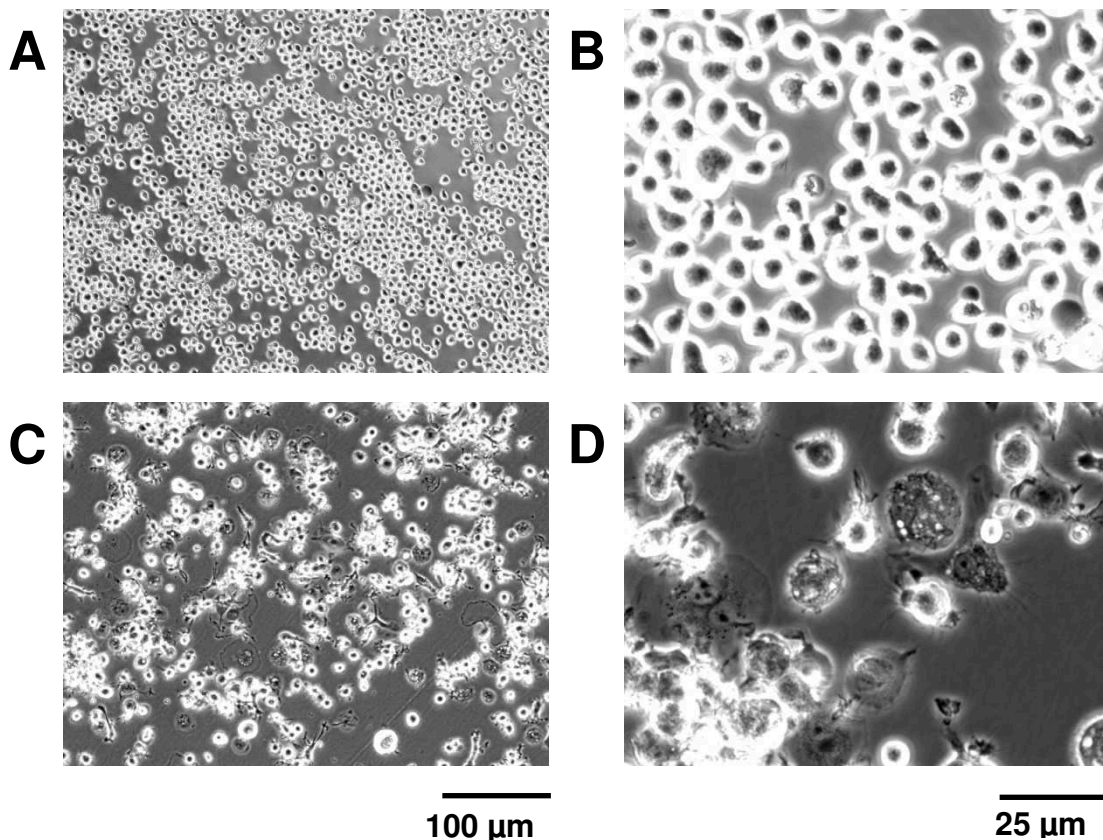


Abb. 5: U-937 Zellen vor und nach Differenzierung zu Makrophagen. Undifferenzierte U-937 Zellen sind in A und B als runde frei im Serum schwimmende Zellen erkennbar. Stark verändert zeigen sich die differenzierten U-937 Makrophagen in C und D: die Zellen werden adhären und bilden zusätzlich durch interzelluläre Wechselwirkungen Nester aus. Neben dieser Veränderung ihrer Morphologie nehmen die Zellen an Größe zu. Maßstabsbalken sind unter den Abbildungen ersichtlich.

4.1.2.5 Inkubation mit Substraten zur Analyse des Östrogen-Metabolismus

Für die Inkubationsversuche wurden je 3 ml U-937 Monozytensuspension in Inkubationsmedium mit einer Zellkonzentration von 500000 Zellen / ml pro Kammer einer 6-Loch-Platte ausgesät. Allen Ansätzen wurde Ascorbinsäure in einer Endkonzentration von 200 µM als Oxydationsschutz zugesetzt. Nach 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C erfolgte die Substratzugabe (radioaktive Östrogene, s. 4.1.1.2). Bei den Experimenten zur Regulation erfolgte gleichzeitig die Zugabe der Agonisten PMA, Dexamethason bzw. FKS.

Parallel zu den Inkubationsansätzen mit radioaktiven Östrogenen wurden, bei sonst gleichen Bedingungen, U-937 Zellen auch mit nicht radioaktivem E1 bzw. E2

versetzt. Diese Ansätze dienten für tägliche Zellzählungen zur späteren Berechnung der auf Zellzahlen bezogenen Produktumsätze.

Bei den U-937 Makrophagen erfolgte die Zugabe des jeweiligen Östrogens als Substrat 3 Stunden nach dem Entzug des zur Differenzierung verwendeten PMA. Das weitere Vorgehen war analog der Versuchsanordnung bei U-937 Monozyten.

48 Stunden nach Zugabe der Östrogene wurde das Medium aller Ansätze entnommen und die noch enthaltenen Zellen abzentrifugiert (600 g, 5 Min). Die Überstände wurden in 15 ml Röhrchen bei -21°C gelagert. Das 48 Stunden Intervall hatte in Vorversuchen ein gutes Maß an produzierten Östrogenmetaboliten bei guter Zellvitalität gezeigt.

4.2 Radio-HPLC-Analyse von Östrogen-Metaboliten

4.2.1 Extraktion der Östrogen-Metaboliten

Nach dem Auftauen der Proben im Wasserbad erfolgte die Zugabe von je 100 µl HCl (37%, rauchend). Nach Ansäuerung des Mediums für 10 Minuten erfolgte die Extraktion der Produkte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion. Als organische Phase wurden pro Ansatz 3 ml Ethylacetat (EA) zugegeben. Um einen Phasenübergang der Östrogenmetaboliten zu ermöglichen, wurden die Röhrchen zweimal für je 30 Sekunden kräftig durchmischt (Vortexmischer). Zur Erleichterung der Phasentrennung wurde 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der organische Überstand wurde in ein neues 15 ml Probengefäß überführt. Nach Zugabe von weiteren 3 ml Ethylacetat zur verbliebenen wässrigen Phase wurde der gesamte Extraktionsvorgang wiederholt. Die EA-Phasen wurden vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator (BA-VC-300H, Saur, Reutlingen) zur Trockne eingeeengt. Bis zur Analyse via Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden die so gewonnenen Proben bei -21°C gelagert.

Bei allen Ansätzen wurde die Effizienz der Extraktionen überprüft. Dazu wurden sowohl der Zellkulturüberstand als auch die vereinigten EA-Phasen gewogen und mit Hilfe der bekannten Dichten (1,0 g / ml bzw. 0,897 g/ml) die exakten Volumina berechnet. Von jedem Ansatz wurden je 30 µl des zentrifugierten Zellkulturüberstandes, 60 µl der vereinigten EA-Phasen und 1 ml der verbliebenen wässrigen Phase mit je 2 ml Ultima Gold Szintillationscocktail im Szintillationszähler vermessen. Die Zählwerte wurden nach Korrektur auf die Hintergrundaktivität

verwendet, um, wie unten angegeben, die Aktivitäten jeder Fraktion, die Wiederfindungen bei der Extraktion, sowie die Extraktionseffizienzen zu berechnen. Die Extraktionseffizienzen lagen bei allen Ansätzen deutlich über 90%, meistens bei ca. 95%. Folgende Algorithmen kamen zur Anwendung:

$$\text{Aktivität einer Fraktion} = \text{korrigierter Zählwert} \cdot \frac{\text{Gesamtvolumen}}{\text{vermessenes Volumen}}$$

$$\text{Wiederfindung bei der Extraktion} = \frac{\sum \text{Aktivitäten der organischen und der wässrigen Fraktion}}{\text{Aktivität des Zellkulturüberstandes}}$$

$$\text{Extraktionseffizienz} = \frac{\text{Aktivität der organischen Phase}}{\text{Aktivität des Zellkulturüberstandes}}$$

4.2.2 Probenvorbereitung für die Radio-HPLC-Analyse

Östrogenmetabolit	Retentionszeit (Minute)	Referenzöstrogen Menge / Lauf (µg)
Östriol (E3)	3,4	2,75
16αOH-E1	5,2	1,5
2OH-E2	6,7	1,5
4OH-E2	6,7	0,75
2OH-E1	8,9	1,5
4OH-E1	9,9	1,5
Östradiol (E2)	11,8	3,5
4MeO-E2	13,0	0,75
2MeO-E2	14,85	3,5
Östron (E1)	16,9	5,5
4MeO-E1	18,75	1,5
2MeO-E1	19,5	3,5

Tab. 1: Elutionszeiten der Östrogene und Östrogenmetaboliten. Angegeben sind die mittleren Retentionszeiten der Standards und die pro Lauf eingesetzten Mengen der jeweiligen Referenzsubstanzen.

Die Solubilisierung der extrahierten Steroide erfolgte in je 20 µl eines nicht radioaktiven Östrogen-Standardmixes (s. 4.2.3.2). Der Standardmix enthielt als Oxidationsschutz für die Östrogene 5 mM Ascorbinsäure. Die nicht radioaktiven Standards konnten im UV-Detektor nachgewiesen werden und dienten so als Referenzen zur Bestimmung der Elutionszeiten der radioaktiven Östrogenmetaboliten ohne deren Messung zu verfälschen (siehe Tab. 1).

4.2.3 Radio-HPLC-Analyse von Östrogen-Metaboliten

4.2.3.1 Das Radio-HPLC-System

Die Analyse der Östrogenmetaboliten wurde an einer HPLC-Anlage durchgeführt, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte: Von Shimadzu (Duisburg) stammten Online Entgaser DGU-14A, Niederdruck-Gradientenmischer FCV-10ALvp, Pumpe LC-10ATvp und Ultraviolett-Detektor SPD-10Avp. Als Injektionsventil wurde das Modell Rheodyne 7725i mit einer 20 µl Probenschleife verwendet. Der Durchfluss-Szintillationsdetektor Typ 505TR war mit einer homogenen 500 µl Durchflusszelle ausgestattet und stammte von PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim). Die HPLC-Säule vom Typ LiChrospher 100 RP-18e (Partikelgröße 5 µm, Dimension 250 x 4 mm) stammten von Merck (Darmstadt) und wurde bei einer Temperatur von 35°C im Wasserbad betrieben.

4.2.3.2 Trennungsbedingungen für Östrogenmetaboliten

Pro Messung wurden 5 µl der Probelösung eingesetzt. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml / Min. Die Laufmittel für die Gradientenelution waren (A) hochgereinigtes Wasser (Milli-Q, Millipore, Schwalbach/Ts.) bzw. (B) Acetonitril (BDH Prolabo, Darmstadt) mit 0,5% Trifluoroacetat (Merck, Darmstadt). Der für die Trennung der Östrogenmetaboliten verwendete Gradient setzte sich wie folgt zusammen: zuerst für 13 Minuten 40% B, dann innerhalb von 3 Minuten auf 80% B, 80% B für 2 Minuten halten, danach Reduzierung auf 40% B in 1 Minute. Nach weiteren 8 Minuten mit 40% B war die Messung beendet. Über die gesamte Laufzeit des Gradienten (27 Min) wurden im Durchfluss-Szintillationsdetektor pro ml Lösungsmittel 3 ml Szintillationscocktail Ultima-Flo M (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim) zugemischt.

Die Detektion der nicht radioaktiven Referenz-Östrogene erfolgte im UV-Detektor bei 215 nm und 280 nm. Die Detektion der radioaktiv markierten Östrogene erfolgte mit Messungsintervallen (update time) von 6 Sekunden.

Ein typisches UV-Chromatogramm, das als Grundlage der Peakidentifizierung diente, ist in Abbildung 6 dargestellt. Unter den zur Trennung der Östrogenmetaboliten verwendeten Bedingungen waren 2OH-E2 und 4OH-E2 nicht trennbar. Für alle anderen identifizierbaren Metaboliten konnte eine sehr gute Trennung erreicht werden.

Zur Quantifizierung der radioaktiven Östrogenmetaboliten wurden die Peakintervalle, die aus den UV-Chromatogrammen ersichtlich waren, verwendet.

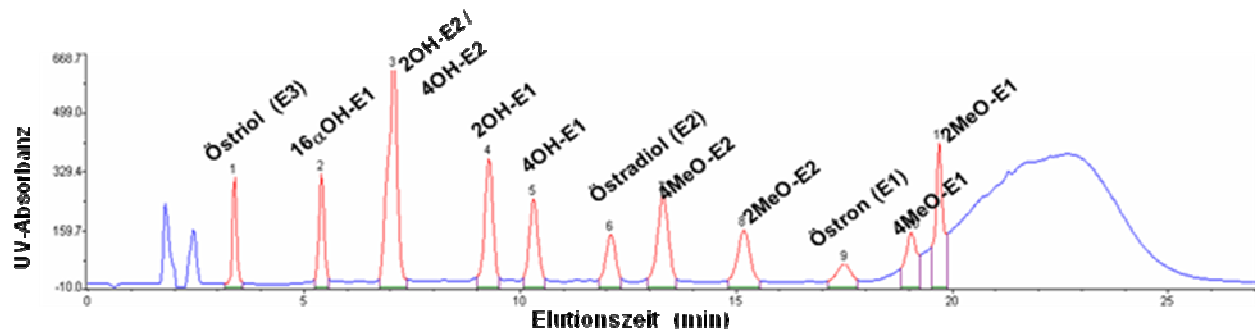


Abb. 6: Typisches Chromatogramm der Trennung der Östrogenmetaboliten. Darstellung der typischen Peakverteilung bei UV-Detektion bei 280 nm. Die identifizierten Östrogene und Östrogenmetaboliten sind jeweils über dem zugehörigen Peak abzulesen. 2OH-E2 und 4OH-E2 lassen sich mit dieser Methode nicht vollständig von einander trennen und werden deshalb als Summe gemessen.

4.2.3.3 Auswertung der Trennungen

An Hand der aus den UV-Chromatogrammen erhaltenen Peakintervalle wurden mit der „Flow One“-Analysesoftware des Radio-HPLC-Detektors für die entsprechenden Zeiträume standardisierte „Regions of Interest“ definiert. Für alle Regions of Interest wurden die Flächenintegrale der vom Detektor gemessenen Aktivität der radioaktiven Östrogenmetaboliten gebildet. Nach Abzug der auf die Peakintervalle korrigierten Hintergrundaktivität wurden für die weitere Analyse alle Peaks als solche anerkannt, deren korrigiertes Flächenintegral größer war als die Summe aus Mittelwert der Hintergrundaktivität plus deren doppelter Standardabweichung. Dabei ist zu erwähnen, dass alle bedeutenden Peaks, und damit >90% der detektierten

Radioaktivität, den o. g. Östrogenen und Östrogenmetaboliten zugeordnet werden konnten.

Mit Hilfe der bei der Extraktion der Östrogenen und Östrogenmetaboliten im Szintillationszähler gemessenen absoluten Aktivitäten der einzelnen Proben konnten jedem Peak entsprechende absolute Aktivitäten (dpm / Peak) zugeordnet werden. Dadurch konnte mit der bekannten spezifischen Aktivität der eingesetzten Östrogene (dpm / pmol) die Stoffmenge zu den jeweiligen Peaks errechnet werden. Mit den ermittelten Zellzahlen wurde dann die gebildete Östrogenmenge in pmol pro Million Zellen berechnet.

Parallel zu den Inkubationsansätzen mit Zellen wurden auch Kontrollansätze ohne Zellen, bei sonst gleichen Bedingungen, mit den radioaktiven Substraten inkubiert. Auch die Ernte, Extraktion und HPLC- Messung erfolgte analog zu den Inkubationsansätzen mit Zellen. Die dabei gemessenen Werte wurden von denen der Zellproben subtrahiert, um die tatsächlich von den U-937 Zellen synthetisierten Mengen der Östrogenmetaboliten zu ermitteln.

4.2.3.4 Datenanalysen und Präsentation

Für die Identifizierung signifikanter Unterschiede der gebildeten Produktmengen bei Vergleichen von verschiedenen behandelten U-937 Zellen wurde üblicherweise der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Grund hierfür war, dass nicht unter allen experimentellen Bedingungen die Ergebnisse normalverteilt waren. Deshalb wurden für die Darstellung der Ergebnisse auch Boxplots gewählt.

Der Student-t-Test wurde zur Datenanalyse verwendet, sofern alle zu vergleichenden Gruppen eine Normalverteilung aufwiesen. In diesen Fällen wurden die Ergebnisse auch als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt.

Zur Analyse und zur graphischen Darstellung der Daten wurde die SigmaPlot Software (Version 11) verwendet (Systat, Erkrath).

4.3 Nachweis der Expression der Catechol-O-Methyltransferase

4.3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der U-937 Monozyten erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den Östrogenkonversionsexperimenten (siehe 4.1.2.5). Einem Teil der U-937 Monozytenansätze wurden zur Prüfung eventueller Regulationswirkungen E2 und / oder FKS zugegeben.

4.3.2 RNA-Isolierung

Die RNA Isolierungen erfolgten mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift mit dem Zentrifugationsprotokoll. Die U-937 Monozyten wurden 5 Min zentrifugiert (600 g), die Kulturmedien verworfen. Die Zellpellets wurden sofort mit 700 µl RLT-Puffer mit Mercaptoethanol lysiert und durch 20maliges Pipettieren homogenisiert. Das weitere Vorgehen erfolgte genau nach Herstellervorgaben.

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte durch Absorbanzmessung bei 260 nm, 280 nm und 340 nm. Die Messwerte bei 260 nm bzw. 280 nm wurden auf die jeweils zugehörigen Absorbanzen bei 340 nm korrigiert.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Präparationen erfolgte nach der Formel

$$c = OD_{260} \times 40 \mu\text{g} / \text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Reinheit der RNA-Präparationen wurde aus dem Quotienten OD_{260} / OD_{280} ermittelt und war immer größer als 1,6.

Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3.3 Erzeugung von cDNA

Zur Gewinnung der cDNA wurde das cDNA Archive Kit von Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden die mit dem Kit gelieferten Zufalls-Hexamere verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei für jeden Ansatz 10 µg RNA in cDNA umgeschrieben wurde. Als Kontrolle für die erfolgreiche cDNA-Herstellung wurde für jeden Ansatz die Expression von β -Actin mittels PCR überprüft (siehe 4.3.4).

4.3.4 PCR-Amplifikation von Catechol-O-Methyltransferase- und β -Actin-Fragmenten

Neben der Bestätigung einer intakt vorliegenden cDNA durch Nachweis des β -Actins wurden mittels PCR auch die Expression der membrangebundenen COMT (MB-COMT) und der löslichen COMT (S-COMT) untersucht. Da die proteinkodierende Sequenz der S-COMT völlig identisch mit dem 3'-Ende der MB-COMT Sequenz ist, war es nicht möglich, Primer abzuleiten, die spezifisch für die S-COMT sind. Deshalb wurden folgende Primersätze verwendet: einer mit ausschließlicher Spezifität für die MB-COMT und ein Primersatz, der sowohl MB-COMT als auch S-COMT cDNA amplifiziert (MB/S-COMT):

MB-COMT	Vorwärts: 5'-gcg gga gag aaa taa cat c- 3' Rückwärts: 5'-cgg cat ctt caa agc ac-3'
MB/S-COMT	Vorwärts: 5'-ggc gac aag aaa ggc aag- 3' Rückwärts: 5'-tgg tga cag cag gcg g-3'
β -Actin	Vorwärts: 5'-cct tcc ttc ctg ggc atg- 3' Rückwärts: 5'-ctt ctg cat cct gtc ggc-3'

Die PCR-Amplifikationen mit den jeweiligen Primersätzen erfolgten mit Taq-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) unter den in Tab. 2 und 3 gegebenen Bedingungen.

Reagenzien in μ l	Beta-Actin	MB-COMT (104bp)	MB/S-COMT (120bp)
Aqua dest.	38	36,5	36,5
Taq-Puffer	5	5	5
dNTP-Mix	5	5	5
Vorwärtsprimer	0,5	0,5	0,5
Rückwärtsprimer	0,5	0,5	0,5
cDNA	0,5	2	2
Taq-Polymerase	0,5	0,5	0,5

Tab. 2: Reaktionsansätze für die PCR. Für die PCR, ausgehend von der isolierten RNA, wurden angegebenen Substrate pipettiert.

	Beta-Actin		MB-COMT		MB/S-COMT	
Initiale Denaturierung	96°C	2min	96°	2min	96°	2min
27 Zyklen	96°	30sek	96°	30sek	96°	30sek
	53°	30sek	59°	5sek	54°	10sek
	72°	30sek	72°	5sek	72°	5sek
End-Elongation	72°	2min	72°	30sek	72°	1min

Tab. 3: PCR-Bedingungen. Temperaturen und Zeiten der Cycloprogramme für die Denaturierung, die Annealing- und die Elongationsphasen der jeweiligen Sequenzen.

4.3.5 Analyse der PCR-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde in 2 %-igen Agarosegelen mit TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; 40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8,0) in Gegenwart von 2 µl Ethidiumbromid durchgeführt. Dafür wurden 2,4 g Agarose eingewogen und mit TAE-Puffer auf 120 ml aufgefüllt. In der Mikrowelle wurden die Komponenten erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Das Befüllen der Elektrophoresekammer erfolgte nach kurzem Abkühlen der Masse und Zugabe von 4 µl Ethidiumbromid-Lösung. Die Proben wurden mit entsprechender Menge Gelladepuffer versetzt und konnten nach Erkalten des Gels in die vorgesehenen Probentaschen pipettiert werden. Die Laufzeit betrug 50 Min bei 115 V. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte durch Detektion der Ethidiumbromid-Fluoreszenz an einem Imaging-System (ImageMaster VDS, Pharmacia, Freiburg).

5. ERGEBNISSE

5.1 Die U-937 Monozyten haben eine überwiegend reduzierende Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Hydroxy- bzw. Methoxyöstrogenen, die von U-937 Zellen gebildet werden. Die verwendete Methode, Inkubation der Zellen mit radioaktiv markierten Östrogenen und quantitative Analyse aller identifizierbaren Produkte, lieferte jedoch auch Daten über die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) in den verwendeten Zellen. Dies war für die vorliegende Arbeit insofern relevant, als für eine andere humane Monozyten-Zelllinie (THP-1) bereits Untersuchungen zur Aktivität der 17 β -HSD vorliegen - wobei dort die Östrogene mittels ELISA Quantifiziert worden waren (Jakob et al. 1995, Jakob et al. 1997).

Die U-937 Monozyten zeigten, wenn auch nicht signifikant ($p=0,056$), eine tendenziell höhere Kapazität zur Reduktion von E1 zu E2, als zur Oxidation von E2 zu E1 (Abb. 7A). Die 17 β -HSD, als verantwortliches Enzym, scheint hier überwiegend reduktiv zu arbeiten.

Bei den U-937 Makrophagen hingegen ist sind Oxidation von E2 bzw. Reduktion von E1 durch die 17 β -HSD nahezu ausgeglichen, Reaktionen finden in beide Richtungen in annähernd gleichem Maße statt (Abb. 7A).

Bildet man den Quotienten aus E2-Produktion zu E1-Produktion für jedes Einzelexperiment, wird der Unterschied zwischen Monozyten und Makrophagen signifikant ($p < 0,01$). Der Quotient beträgt bei den U-937 Monozyten (Median= 1,75) etwa das Doppelte des Quotienten der Makrophagen (Median= 0,8) (Abb. 7B). Die vorliegenden Messwerte zeigen also ein deutliches Übergewicht einer reduktiven 17 β -HSD in der Monozytenkultur, während bei den Makrophagen keine Vorzugsrichtung für die 17 β -HSD existiert.

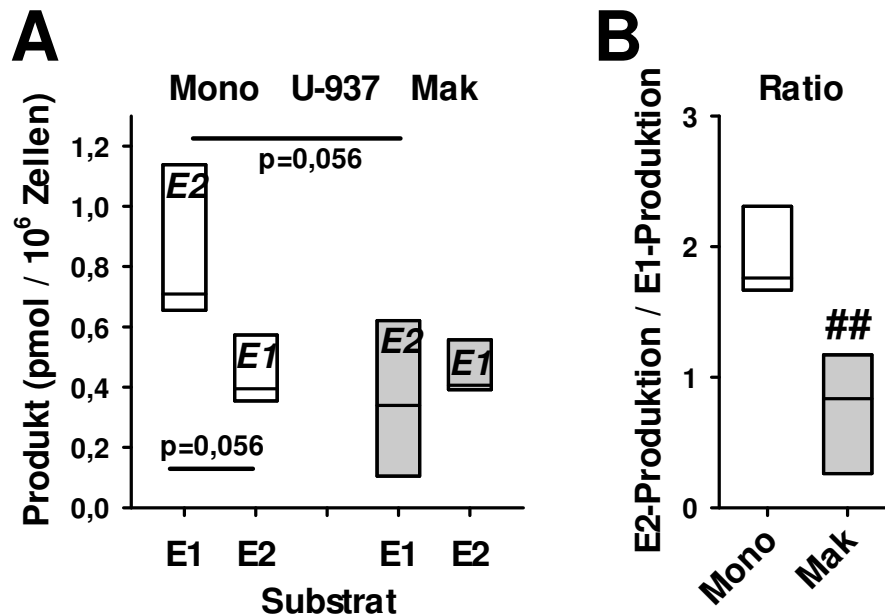


Abb. 7: Auswirkung der Differenzierung auf die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase von U-937 Zellen. (A) U-937 Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben als Monozyten (Mono) bzw. nach Differenzierung zu Makrophagen (Mak) für die Experimente eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von je 5 unabhängigen Experimenten für U-937 Monozyten (Mono) bzw. Makrophagen (Mak). Die Boxplots zeigen die Östron (E1)- und Östradiol (E2)-Produktion der Zellen. Die Produkte sind jeweils in den Boxen angegeben, die die gebildete Produktmenge darstellen (Boxen von 25. bis 75. Perzentile mit Median als horizontaler Linie), die eingesetzten Substrate auf der Horizontalachse. Die Syntheseleistung der U-937 Zellen wird vertikal in picomol Metabolit / Million Zellen dargestellt. Die Datenanalyse wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die gefundenen Unterschiede zwischen E1- und E2-Produktion bei Monozyten bzw. in der E2-Produktion zwischen Monozyten und Makrophagen verfehlen knapp das Signifikanzkriterium ($p < 0,05$). (B) Darstellung der Verhältnisse (Ratio) der E2-Produktion zur E1-Produktion durch U-937 Zellen. Die Boxen repräsentieren die Ergebnisse aus je 5 Experimenten. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Produktionsverhältnisse bei Monozyten bzw. Makrophagen (Mann-Whitney-U-Test; ##, $p < 0,01$)

5.2 Die Bildung von Hydroxyöstrogenen nimmt bei der Differenzierung von U-937 Zellen zu Makrophagen ab

In Kulturüberständen von U-937 Zellen wurden mit der verwendeten HPLC-Methode folgende Hydroxylierungsprodukte von Östrogenen identifiziert: 2OH-E1 (Abb.8A), 4OH-E1 (Abb.8B), 16 α OH-E1 (Abb.8C) und 16 α OH-E2 (E3, Abb.8E). Da die Methode die zweifelsfreie Unterscheidung zwischen 2OH-E2 und 4OH-E2 nicht erlaubte, konnte in diesem Fall nur die Summe der aus E2 gebildeten Catechol-Metaboliten nachgewiesen werden, die als 2/4OH-E2 bezeichnet wurde (Abb.8D). Die Produktion der identifizierten Hydroxyöstrogene zeigte sich bei den Makrophagen gegenüber den Monozyten reduziert. Diese verringerte Produktion war als Tendenz

bei allen Hydroxyöstrogenen zu erkennen (Abb. 8). Signifikant wurde diese verringerte Produktion durch Makrophagen für 2OH-E1 (Abb. 8A) und 4OH-E1 (Abb. 8B). Auch die Summe aller produzierten Hydroxyöstrogene ausgehend von E1 als Edukt war bei Makrophagen signifikant geringer als bei Monozyten (Abb. 8F), ausgehend von E2 war der Rückgang der Hydroxylierungsprodukte zwar nicht signifikant, aber deutlich (Median für Makrophagen kleiner 20 % des Medians für Monozyten).

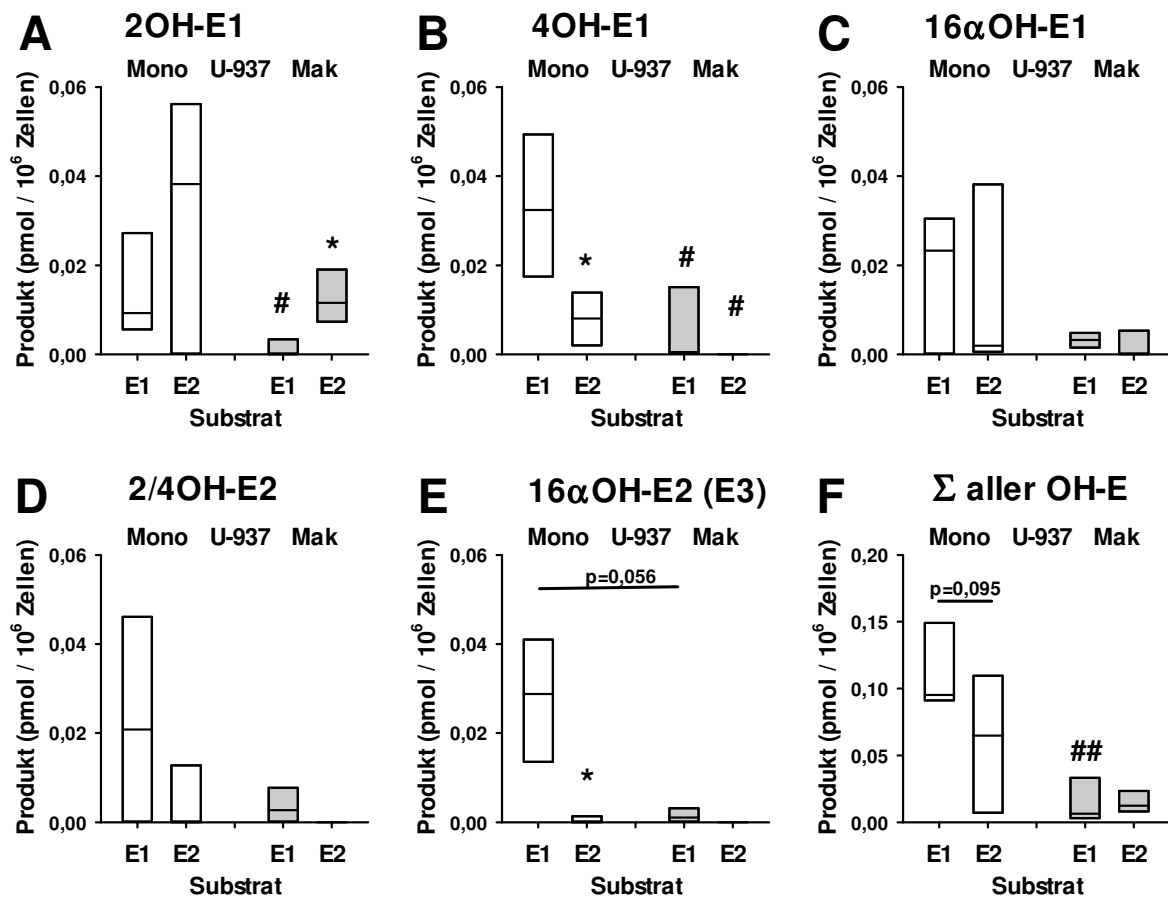


Abb. 8: Produktion von Hydroxyöstrogenen durch U-937 Zellen. U-937 Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben als Monozyten (Mono) bzw. nach Differenzierung zu Makrophagen (Mak) für die Experimente eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von je 5 unabhängigen Experimenten für U-937 Monozyten (Mono) bzw. Makrophagen (Mak). Die Boxplots zeigen die Östron (E1)- und Östradiol (E2)-Produktion der Zellen. Die gebildeten Produktmengen sind in Form von Boxplots dargestellt (Boxen von 25. bis 75. Perzentile mit Median als horizontaler Linie), die eingesetzten Substrate sind auf der Horizontalachse angegeben. Die Ergebnisse für Monozyten sind in Form weißer Boxen, die für Makrophagen in Form grauer Boxen dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test identifiziert. *, Unterschied zum zugehörigen Datensatz mit E1 als Substrat signifikant ($p < 0,05$); # bzw. ##, Unterschied zum zugehörigen Datensatz bei Monozyten signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Identifizierte Hydroxyöstrogene: 2OH-E1 (A), 4OH-E1 (B), 16αOH-E1 (C), 2/4OH-E2 (D), 16αOH-E2= E3 (E). (F) Summe aller identifizierten Hydroxyöstrogene.

5.3 Die Catechol-O-Methyltransferase ist für die Bildung von Methoxyöstrogenen durch U-937 Zellen verantwortlich

5.3.1 Die Konversion zu Methoxyöstrogenen ist bei den U-937 Makrophagen reduziert

Sowohl in U-937 Monozyten als auch in U-937 Makrophagen war die Konversion von Catecholöstrogenen zu Methoxyöstrogenen nachweisbar. Identifiziert wurden 2MeO-E1 (Abb. 9A), 4MeO-E1 (Abb. 9B), 2MeO-E2 (Abb. 9C) und 4MeO-E2 (Abb. 9D). Wie bei den Hydroxyöstrogenen waren die gebildeten Mengen der einzelnen Methoxyöstrogene bei den Makrophagen in der Tendenz kleiner als bei den Monozyten (d. h. die Betrachtung der Mediane). Statistisch signifikant war der Rückgang für 4MeO-E2 (Abb. 9D) und für die Summe aller Methoxyöstrogene (Abb. 9E).

Bei etwa 50 % der gebildeten Methoxyöstrogene handelt es sich um 2MeO-E2 (vgl. Abb. 9C und 9E). Dieser Metabolit ist auch wesentlich dafür verantwortlich, dass die Summe aller Methoxyöstrogenmengen, die ausgehend von E2 als Substrat gebildet wurden, signifikant größer war, als die ausgehend von E1 gebildeten (Abb. 9E). Dies galt sowohl für Monozyten als auch für Makrophagen .

Die Summen aller gebildeten Hydroxy- und Methoxyöstrogene waren bei Makrophagen signifikant geringer als bei Monozyten (Abb. 9F). Auffällig war hier aber, dass es keine Unterschiede in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat gab – was auf eine bevorzugte Bildung der Methoxyöstrogene in Gegenwart von E2 hinwies.

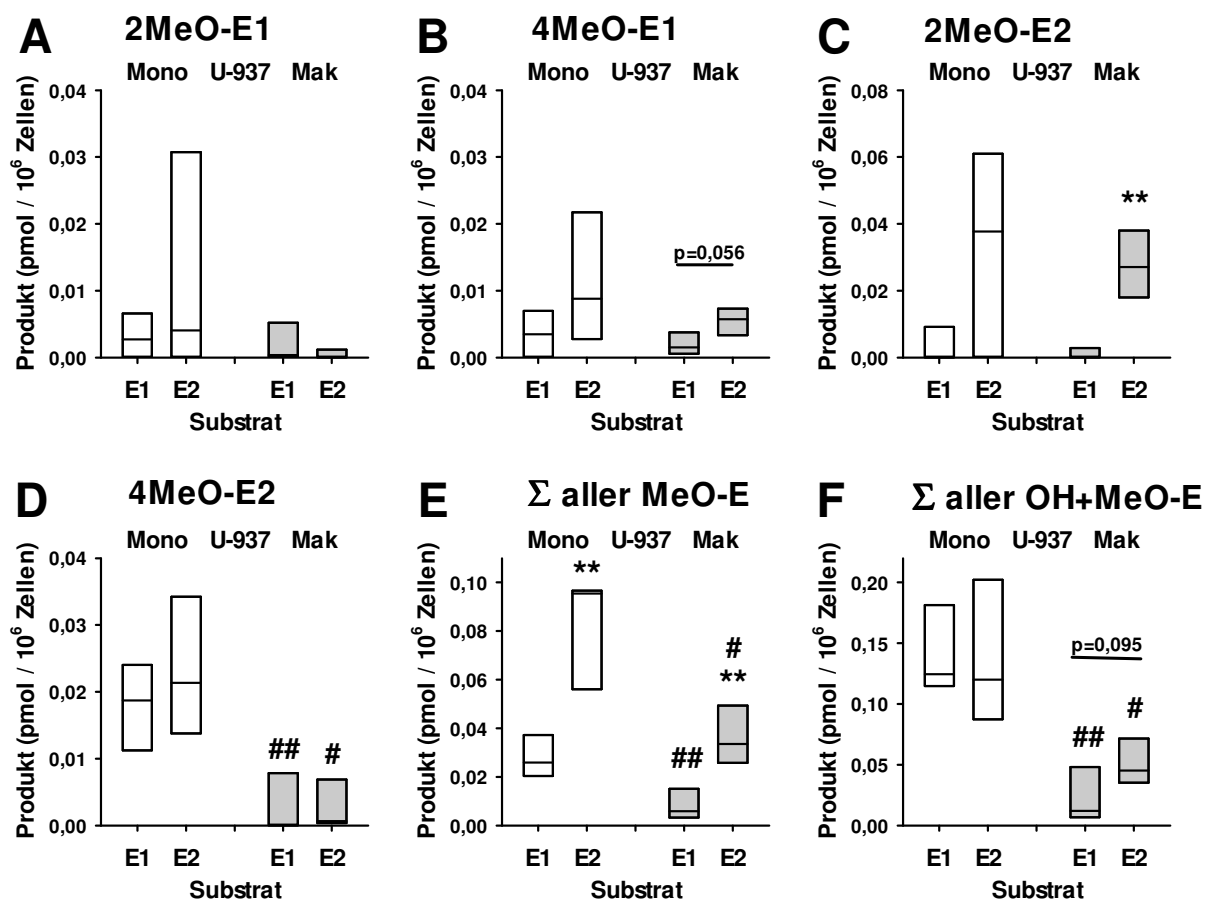


Abb. 9: Produktion von Methoxyöstrogenen durch U-937 Zellen. U-937 Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben als Monozyten (Mono) bzw. nach Differenzierung zu Makrophagen (Mak) für die Experimente eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von je 5 unabhängigen Experimenten für beide Zelltypen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test identifiziert. **, Unterschied zum zugehörigen Datensatz mit E1 als Substrat signifikant ($p < 0,01$); # bzw. ##, Unterschied zum zugehörigen Datensatz bei Monozyten signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Identifizierte Methoxyöstrogene: 2MeO-E1 (A), 4MeO-E1 (B), 2MeO-E2 (C), 4MeO-E2 (D). (E) Summe aller identifizierten Methoxyöstrogene. (F) Summe aller identifizierten Hydroxyöstrogene und Methoxyöstrogene.

5.3.2 Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase führt zu verringerter Bildung von Methoxyöstrogenen

Da prinzipiell verschiedene Enzyme zur Methylierung von Hydroxygruppen im stande sind, wurde der Einfluss des etablierten COMT-Hemmstoffes OR 486 auf die Bildung von Methoxyöstrogenen durch U-937 Zellen getestet. Dazu wurde U-937 Monozyten unmittelbar vor Substratzugabe (E2) zusätzlich OR 486 in verschiedenen Konzentrationen (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M) zugesetzt. Bei allen eingesetzten Konzentrationen des COMT-Inhibitors zeigte sich eine Verringerung der

nachgewiesenen Mengen an Methoxyöstrogenen, signifikant war diese Verringerung für 4MeO-E2 (Abb. 10A) und für die Summe aller Methoxyöstrogene (Abb. 10B). Diese Experimente bestätigen die Annahme, dass die Methylierung der Hydroxyöstrogene in U-937 Zellen hauptsächlich durch COMT erfolgt.

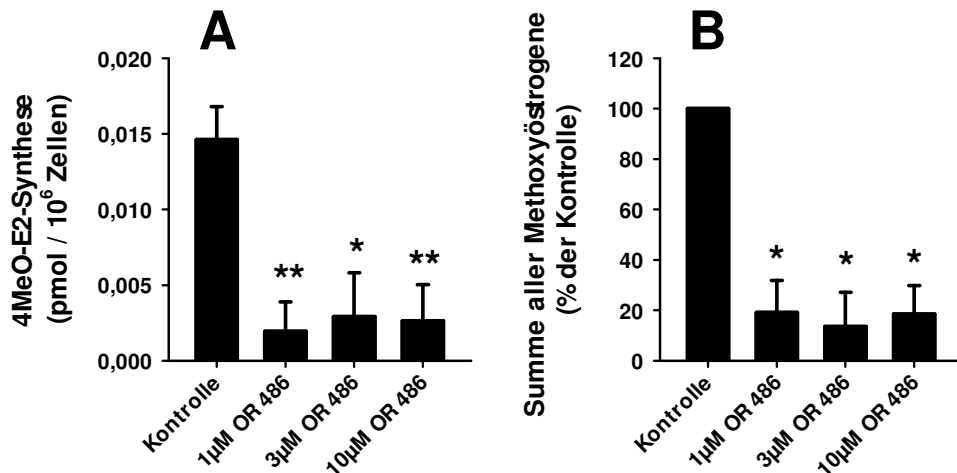


Abb. 10: OR 486 hemmt die Bildung von Methoxyöstrogenen. U-937 Monozyten wurden wie unter 4.1.2 beschrieben für die Experimente in Gegenwart von E2 als Substrat eingesetzt. Dargestellt sind die Produktion von 4MeO-E2 (A) und die Summe aller produzierten Methoxyöstrogene (B). Alle Konzentrationen des COMT-Inhibitors OR 486 führen zur signifikanten Reduktion der gebildeten Methoxyöstrogene. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test identifiziert. Unterschied zur zugehörigen Kontrolle signifikant: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

5.3.3 Nachweis der Catechol-O-Methyltransferase-mRNA

Zur Ermittlung des Subtyps der von den U-937 Zellen exprimierten COMT wurde aus U-937 Monozyten RNA gewonnen und davon ausgehend mit Hilfe der reversen Transkriptase cDNA hergestellt. Daraus wurden mittels PCR Teile der für MB-COMT bzw. für MB/S-COMT (Summe aus MB und S-COMT) kodierenden cDNAs amplifiziert und per Gelelektrophorese analysiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche RNA Isolierung und cDNA Synthese wurde β -Actin nachgewiesen.

Mittels Ethidiumbromidfärbung der Agarosegele konnten PCR-Produkte für β -Actin und die MB/S-COMT nachgewiesen werden (Abb. 11). Damit ist zumindest das Vorkommen einer der beiden COMT-Varianten nachgewiesen. Da jedoch unter keiner Bedingung ein MB-COMT spezifisches PCR-Produkt erhalten wurde (Abb. 11), scheinen die U-937 Zellen ausschließlich S-COMT zu exprimieren. Die

Expression der COMT-Varianten ist unabhängig von der Anwesenheit von FKS bzw. E2.

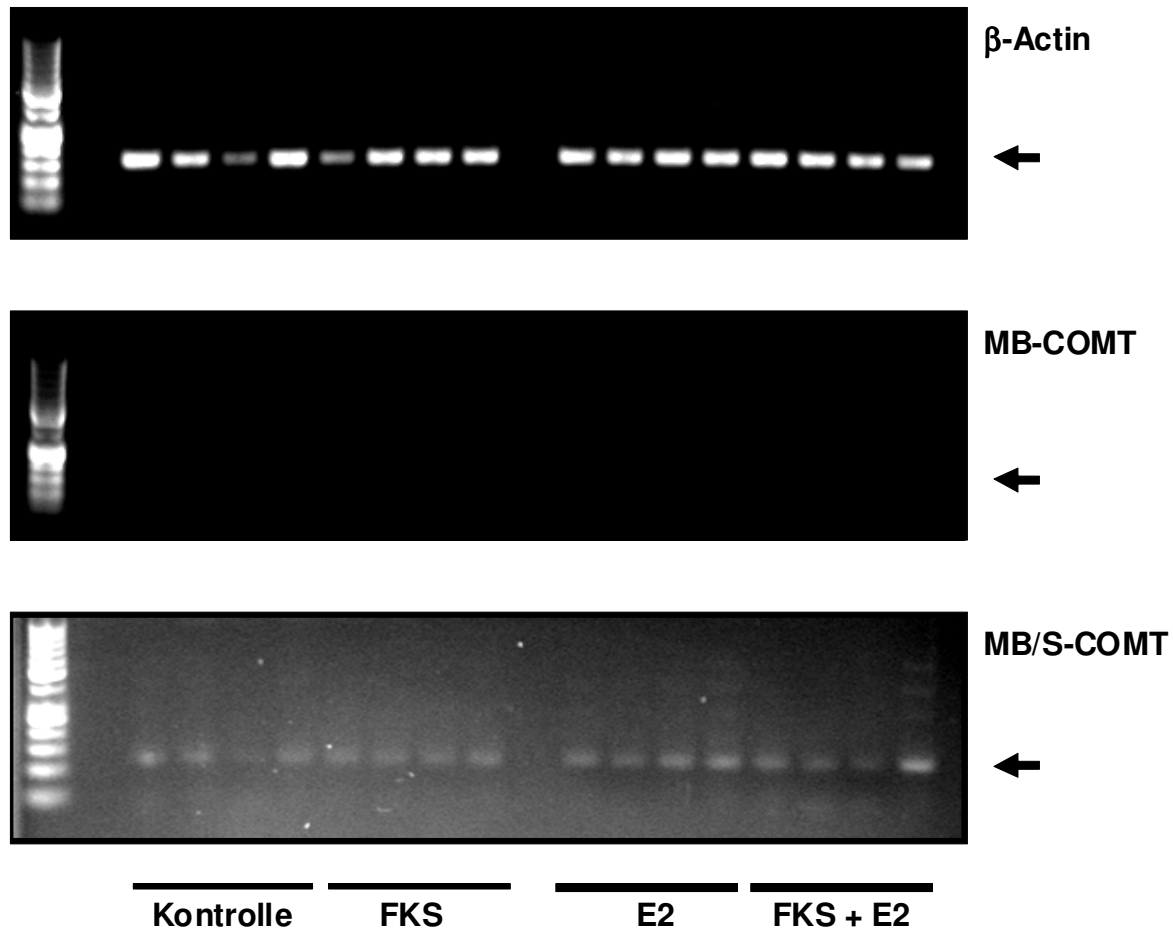


Abb. 11: PCR-Nachweis von COMT und β-Actin. U-937 Monozyten wurden wie unter 4.1.2 beschrieben kultiviert und ohne oder mit FKS bzw. E2 unter denselben Bedingungen inkubiert, wie sie für die Steroidkonversionsexperimente verwendet wurden. Die Gewinnung der RNA, cDNA und die PCR erfolgten wie unter 4.3 beschrieben. Für jede Bedingung wurden vier unabhängige Zellkulturansätze analysiert. Im oberen Agarosegel sind die PCR-Produkte für β-Actin zu sehen, das als Qualitätskontrolle für RNA-Isolierung und cDNA-Synthese dient. Die MB-COMT konnte nicht nachgewiesen werden (Mitte), obwohl die PCR-Bedingungen zum Nachweis der MB-COMT aus HepG2-Zellen geeignet waren (Daten nicht gezeigt). Ein MB/S-COMT spezifisches PCR-Produkt konnte hingegen nachgewiesen werden (unteres Agarosegel). Die Inkubationsbedingungen der Zellen sind unter den Gelen angegeben: Kontrolle; U-937 Zellen im serumfreien Medium. FKS; U-937 Zellen im Medium mit 10% FKS. E2; U-937 Zellen im serumfreien Medium mit Zusatz von 10 nM E2. FKS+E2; U-937 Zellen mit 10% FKS und 10 nM E2.

5.4 Untersuchungen zur Regulation

In weiteren Experimenten wurden die U-937 Zellen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt, von denen bekannt ist, dass sie Einfluss auf verschiedene Leistungen der U-937 Zellen haben. Dazu wurde den Zellen PMA, Dexamethason (Dex), Fetales Kälberserum (FKS) und Dexamethason in Kombination mit FKS zugesetzt. Im Vergleich mit unbehandelten Zellen konnten so Unterschiede bei der Synthese von E1, E2 und auch anderer Östrogenmetaboliten durch die U-937 Zellen analysiert werden.

5.4.1 Phorbol 12-myristat 13-acetat und die Anwesenheit von Serum regulieren die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen von U-937 Makrophagen bzw. Monozyten

Die wechselseitige Konversion von E1 zu E2 bzw. von E2 zu E1, als Leistung der 17 β -HSD, zeigte bei U-937 Monozyten nur in Gegenwart von PMA eine signifikante Abweichung zur Kontrolle (U-937 Monozyten in serumfreiem Medium) (Abb. 12A). In Gegenwart von PMA fand E1-Bildung bzw. E2-Bildung in gleichem Ausmaß statt, während unter allen anderen Bedingungen die E2-Bildung überwog. Das PMA bewirkte im Vergleich zur Kontrolle und allen anderen getesteten Kulturbedingungen eine verstärkte Bildung von E1 aus E2, also eine Aktivierung der oxidativen 17 β -HSD (Abb. 12C). Auf die reduktive 17 β -HSD und damit die E2 Bildung aus E1 hat PMA keinen signifikanten Einfluss (Abb. 12B).

Bei U-937 Makrophagen war ein deutlicher Abfall des Quotienten aus E2-Bildung zu E1-Bildung im Vergleich mit U-937 Monozyten zu erkennen (vgl. Abb. 12A und 12D). Die getesteten Bedingungen hatten keinen Einfluss auf den Quotienten. Allerdings verringerte die Anwesenheit von Serum (FKS) die Rate der E1 Produktion signifikant, PMA und Dexamethason hatten keine Auswirkungen (Abb. 12F). Ein ähnlicher Trend ergab sich auch für die E2-Syntheserate, wobei hier der Effekt nicht signifikant war (Abb. 12E).

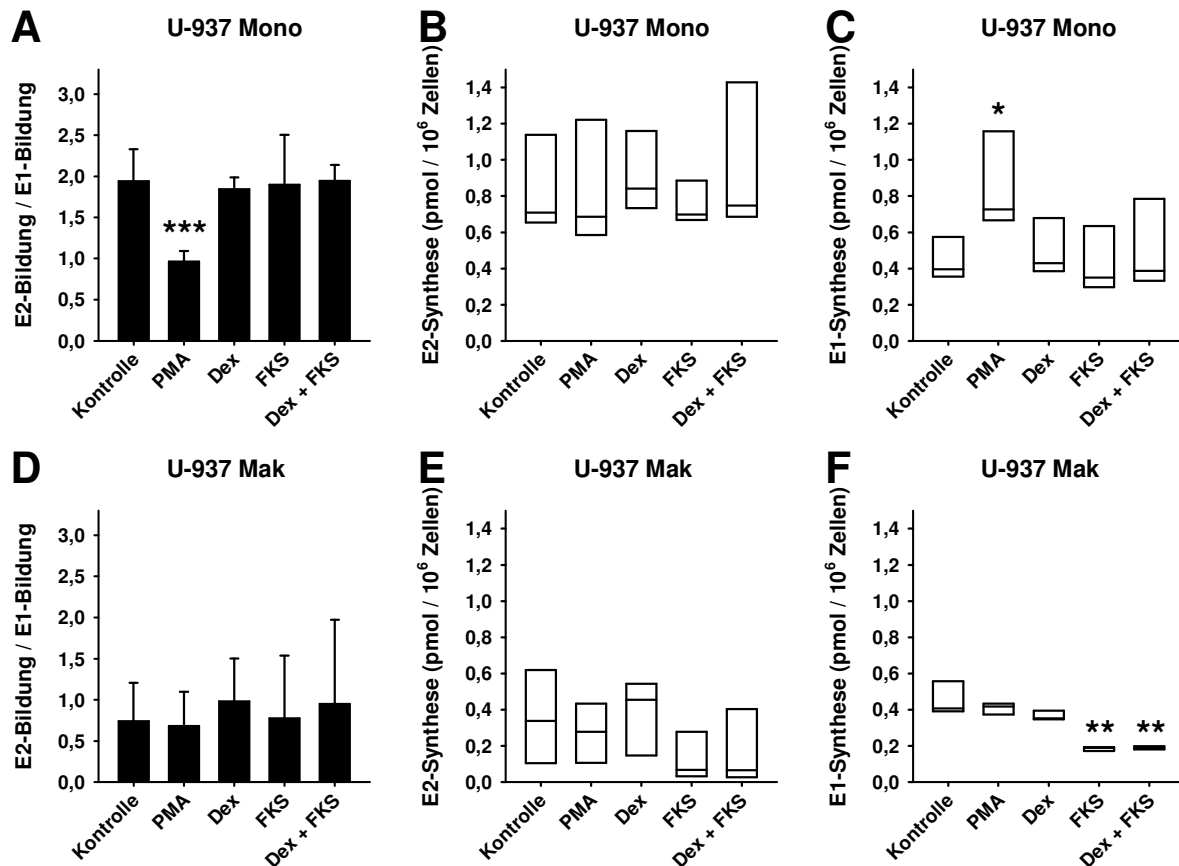


Abb. 12: Regulation der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase. U-937 Zellen wurden wie unter 4.1.2 beschrieben als Monozyten (Mono) bzw. nach Differenzierung zu Makrophagen (Mak) für die Experimente eingesetzt. Die Zellen wurden entweder ohne Zusätze oder in Gegenwart von 8 nM PMA, 100 nM Dex bzw. 10 % FKS mit Östrogenen inkubiert. Dargestellt sind die Ergebnisse von je 5 unabhängigen Experimenten für beide Zelltypen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben, in (A) und (D) sind die Daten als Mittelwerte \pm SD dargestellt, da alle zu vergleichenden Gruppen eine Normalverteilung aufwiesen. Dargestellt sind die Quotienten von E2-Bildung zu E1-Bildung für U-937 Monozyten (A) bzw. Makrophagen (D), sowie die absoluten Syntheseraten von E2 (B) bzw. E1 (C) für U-937 Monozyten bzw. Makrophagen (E) bzw. (F). Signifikante Unterschiede zu den zugehörigen Kontrollen wurden mit Student's t-Test (***, $p \leq 0,001$) bzw. mit dem Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$) identifiziert.

5.4.2 Serum bewirkt eine Hemmung der 16 α -Hydroxylierung von Östron

Auch Einflüsse der zugesetzten Reagenzien auf die Synthese der Hydroxy- und Methoxyöstrogene wurden untersucht. Dabei wurde eine vollständige Hemmung der Produktion von 16 α OH-E1 durch fetales Kälberserum (FKS) bei den U-937 Makrophagen gemessen (Abb. 13B). Bei den Monozyten erfolgte keine signifikante Verringerung der Produktion des 16 α OH-E1 unter Serumeinfluss (Abb. 13A).

Für alle anderen untersuchten Metaboliten war keine Regulation durch PMA, Dexamethason bzw. FKS nachweisbar.

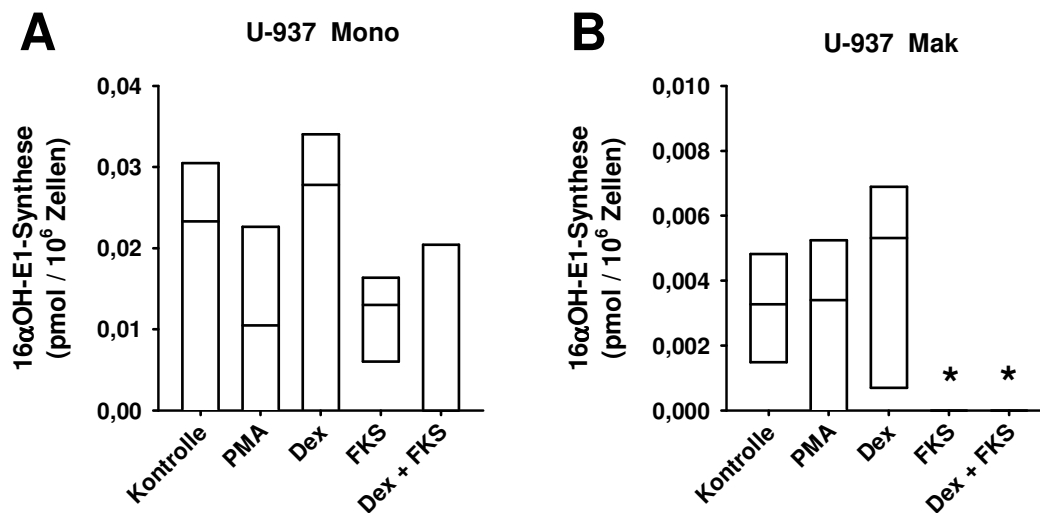


Abb. 13: Serum bewirkt eine Hemmung der 16 α -Hydroxylierung von Östron. U-937 Zellen wurden wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben kultiviert. Die Boxplots zeigen die durch Monozyten (A) bzw. Makrophagen (B) aus dem Substrat E1 produzierten Mengen an 16 α OH-E1. Signifikante Unterschiede zu den zugehörigen Kontrollen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (*, $p \leq 0,05$) identifiziert.

6. DISKUSSION

6.1 Das experimentelle System und die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

Für die Analyse des zellulären Steroidmetabolismus hat sich die Verwendung radioaktiv markierter Substrate in Verbindung mit chromatographischen Trennungsmethoden bewährt. In unserer Arbeitsgruppe wurden in der Vergangenheit verschiedene Steroidklassen mit derartigen Verfahren untersucht. Dabei kam als Trennverfahren meist die Dünnschichtchromatographie zur Anwendung, die sich durch besonders günstige Analysekosten auszeichnet (Schmidt et al. 2005a, Schmidt et al. 2005b, Weidler et al. 2005). Ausgehend von einem beliebigen radioaktiv markierten Substrat können so alle entstehenden Metaboliten identifiziert werden.

Um den Östrogenmetabolismus der U-937 Modellzellen analysieren zu können, mussten als radioaktiv markierte Substrate E1 bzw. E2 verwendet werden. Da diese bzw. die aus ihnen gebildeten Metaboliten in unterschiedlichem Ausmaß empfindlich gegen Oxidation sind, wurde nach entsprechenden Vorversuchen in dieser Arbeit und anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Schmidt et al. 2009) für die Analyse der Östrogenmetaboliten eine HPLC-Trennmethode verwendet, bei der Ascorbinsäure als Oxidationsschutz durchgängig verwendbar war.

Da die verwendete Methode quantitative Informationen über alle aus den Substraten gebildeten Produkte liefert, ließen sich auch Aussagen über die Aktivität der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17 β -HSD) in den verwendeten Zellen machen (s. 5.1). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen hohen Aktivitäten der 17 β -HSDs in Monozyten sind vergleichbar mit der in früheren Arbeiten mit THP-1 Zellen, einer anderen humanen Monozyten-Zelllinie, gefundenen starken Expression (Jakob et al. 1995, Jakob et al. 1997).

Das System der 17 β -HSDs ist gekennzeichnet durch die Existenz verschiedener Isoenzyme, die entweder E1 zu E2 aktivieren (17 β -HSDs 1, 3, 5) oder E2 zu E1 inaktivieren (17 β -HSDs 2, 4, 8, 10) (Mindnich et al. 2004). Bei der PMA-induzierten Differenzierung von U-937 Zellen verringerte sich die Aktivität der reduktiven 17 β -HSD, so dass in U-937 Makrophagen keine Vorzugsrichtung für die 17 β -HSD

Reaktion mehr existierte (Abb. 7). Dies wäre am einfachsten durch verringerte Expression bzw. Aktivität einer reduktiven 17 β -HSD erklärbar.

Bei den Experimenten zur Regulation der 17 β -HSD Aktivitäten stieg nach 48 h PMA-Behandlung von U-937 Monozyten die Aktivität einer oxidativen 17 β -HSD an (s. Abb.12C). Erst die durch langdauernde PMA-Stimulation induzierte Differenzierung zu Makrophagen führt zum Rückgang sowohl der oxidativen als auch der reduktiven 17 β -HSD Aktivitäten mit dem oben bereits erwähnten Resultat des Verlustes einer Vorzugsrichtung. Weitergehende Aussagen lassen sich basierend auf den benutzten experimentellen Methoden nicht treffen.

6.2 Produzierte Östrogenmetaboliten

Die Östrogenmetaboliten mit relevantem Einfluss auf lokale Entzündungsreaktionen sind unter anderem die 2-, 4- und 16-Hydroxyöstrogene (2OH-E1, 2OH-E2, 4OH-E1, 4OH-E2 und 16 α OH-E1 bzw. 16 α OH-E2 = E3 (Östriol)) sowie die entsprechenden 2- und 4-Methoxyöstrogene (2-/4MeO-E1/E2) (Straub 2007). Die 2- bzw. 4-Hydroxy- und Methoxyöstrogene bewirkten in gemischten Synoviozytenpräparationen von RA- und OA-Patienten eine reduzierte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α (Schmidt et al. 2009) und werden deshalb hier als antiinflammatorisch betrachtet. TNF- α ist einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren bei der RA und das TNF- α Signalsystem ist Ziel verschiedener therapeutischer Optionen mit sogenannten Biologika (Feldmann und Maini 2003). Alle der oben genannten, in den gemischten Synoviozytenpräparationen antiinflammatorisch wirksamen Metaboliten, konnten in dieser Arbeit auch als Produkte der verwendeten U-937 Modellzellen nachgewiesen werden (Abb. 8 und 9). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass Monozyten über die Bildung der 2- bzw. 4-Hydroxy- bzw. Methoxyöstrogene hemmend auf eine TNF- α getriggerte (Auto-)immunreaktion wirken.

Die 16-hydroxylierten Östrogenmetaboliten (16 α OH-E1 und 16 α OH-E2) hingegen zeigten in den Experimenten mit gemischten Synoviozyten keinen hemmenden Einfluss auf die TNF- α Produktion (Schmidt et al. 2009). Auch in anderen Arbeiten zeigten die 16 α OH-Östrogene tendenziell proinflammatorische Effekte (Straub 2007). Vor diesem Hintergrund ist es durchaus plausibel, dass die U-937 Monozyten, verglichen mit den gemischten Synoviozytenpräparationen nur sehr geringe Mengen an 16-hydroxylierten Östrogenen bilden, da es sich bei den Monozyten um die im

Sinne eines Entzündungsprozesses inaktiven Makrophagenvorläufer handelt. In der Zusammenschau kann somit festgestellt werden, dass die U-937 Monozyten überwiegend antiinflammatorische Östrogenmetaboliten bilden.

6.3 Makrophagen verlieren die Fähigkeit zur Synthese antiinflammatorischer Östrogenmetaboliten

Die Mengen fast aller nachgewiesenen Östrogenmetaboliten verringerten sich bei Differenzierung der U-937 Zellen zu Makrophagen. Da U-937 Monozyten fast ausschließlich entzündungshemmende Östrogenmetaboliten produzieren, folgt daraus, dass mit der Differenzierung zum Makrophagen die Fähigkeit zur Synthese dieser antientzündlichen Metaboliten verloren geht (Abb. 8 und 9).

Aus Untersuchungen an anderen experimentellen Systemen ist bekannt, dass die CYPs, die die Hydroxylierungsreaktionen an den Östrogenen katalysieren, eine relativ geringe Regioselektivität für diese Hydroxylierungen zeigen (Lee et al. 2001), (Lee et al. 2003). Die Untersuchungen zur Wirkung der Östrogenmetaboliten auf gemischte Synoviozytenpräparationen haben gezeigt, dass unabhängig von der Hydroxylierungsstelle alle 2- und 4-Hydroxy- und Methoxyöstrogene antiinflammatorisch wirken (Schmidt et al. 2009). Folglich erscheint es sinnvoll, die Metaboliten nicht ausschließlich isoliert zu betrachten (s. 5.2 und 5.3.1), sondern nach charakteristischen Mustern in den Metabolitprofilen von U-937 Monozyten und U-937 Makrophagen zu suchen. Dabei wird noch deutlicher als bei Betrachtung einzelner Metaboliten ersichtlich, dass die U-937 Makrophagen die Fähigkeit zur Synthese dieser Metaboliten weitgehend verlieren. Das gilt für die Summe aller an Position 2 bzw. 4 modifizierten Metaboliten von E1 (Abb. 14A), E2 (Abb. 14B) oder aller Östrogene (Abb. 14C). Das gilt auch für die Summe aller 2- bzw. 4-hydroxylierten Östrogene (Abb. 14D) bzw. der entsprechenden Methoxyöstrogene (Abb. 9E).

Von dem allgemeinen Trend ausgenommen erscheint 2MeO-E2 (Abb. 9C). Dieser Metabolit des 2OH-E2 wird von U-937 Makrophagen in fast der gleichen Menge produziert wie in U-937 Monozyten. Das legt die Beteiligung von mindestens zwei Isoenzymen der CYP-Familie an der Produktion der Hydroxyöstrogene in U-937 Zellen nahe. Realtime-PCR-Quantifizierungen von CYP-mRNAs in U-937 Zellen

zeigten, dass mehrere für die Östrogenhydroxylierung in Frage kommende CYPs exprimiert werden (R. Hartung, persönliche Mitteilung). Sowohl CYP3A4 als auch CYP3A5 hydroxylieren bevorzugt die Position 2 des Östradiol und stellen somit Kandidaten für diese Hydroxylase in U-937 Zellen dar (Lee et al. 2001). Dagegen kann eine Rolle für CYP3A7 weitgehend ausgeschlossen werden, das dieses Enzym zwar E2 bevorzugt an Position 2 hydroxyliert, aber bei E1 als Substrat die 16 α -Hydroxylierung dominieren müsste (Lee et al. 2003). Die Fähigkeit zur Bildung von 16 α OH-E1 geht aber bei der Differenzierung der U-937 Zellen zu Makrophagen fast vollständig verloren.

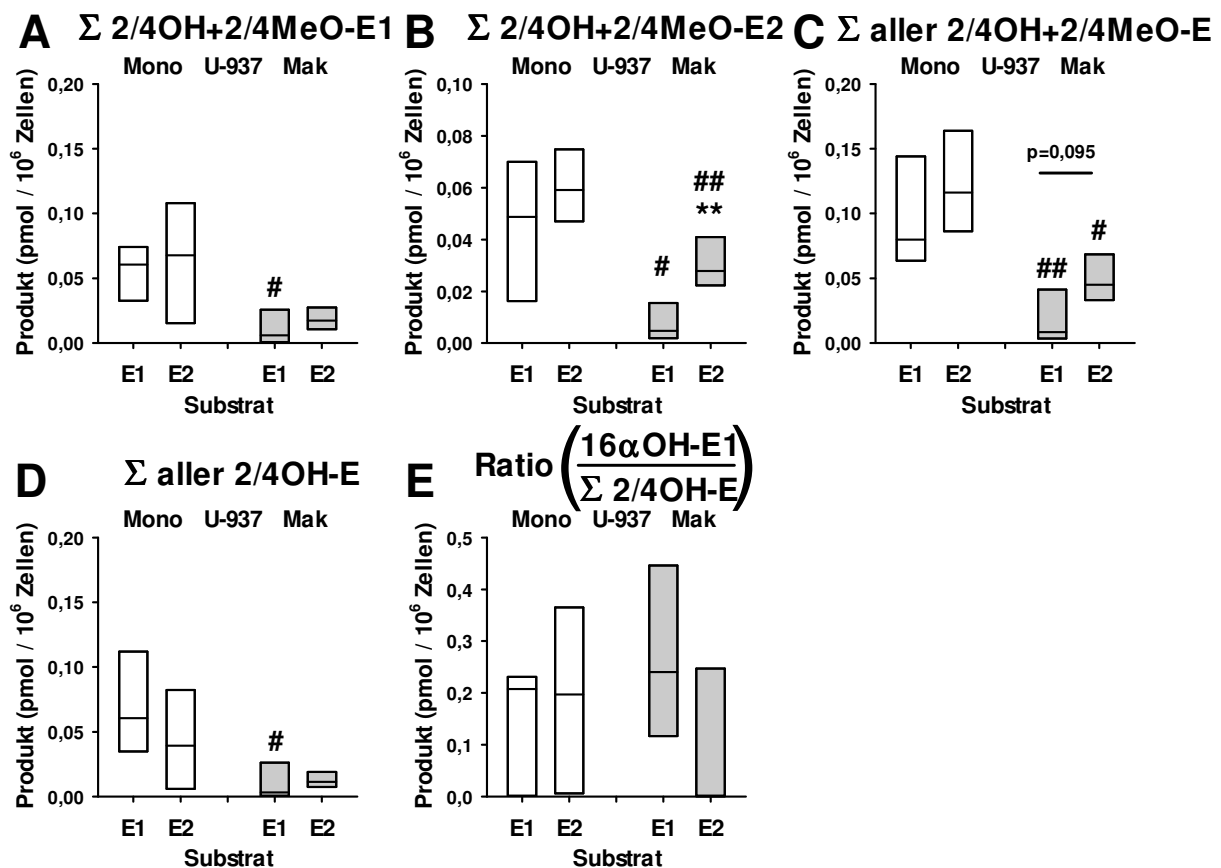


Abb. 14: Analyse von Mustern der Metabolitproduktion durch U-937 Zellen. Die Summenberechnungen wurden auf Basis der in Abbildungen 8 und 9 gezeigten Produktmengen durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 8 beschrieben. Signifikante Unterschiede zwischen Datensätzen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test identifiziert. **, Unterschied zum zugehörigen Datensatz mit E1 als Substrat signifikant ($p < 0,01$); # bzw. ##, Unterschied zum zugehörigen Datensatz bei Monozyten signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). (A) Summe aller an Position 2 bzw. 4 modifizierten Metaboliten von E1, (B) von E2, (C) aller Östrogene. (D) Summe aller 2- bzw. 4-hydroxylierten Östrogene. (E) Verhältniss von 16 α OH-E1 zur Summe aller 2- bzw. 4-hydroxylierten Östrogene.

Für die Synthese von 16 α OH-E1 muss hauptsächlich ein Enzym verantwortlich sein, das sich durch seine verringerte Expression in U-937 Makrophagen (s. 5.2) und dort durch seine Hemmbarkeit durch Serum auszeichnet (s. 5.4.2). Dafür stellt CYP3A7 einen guten Kandidaten dar (Lee et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch geklärt werden, ob Makrophagen für die 16 α OH-E1 Produktion, die bei gemischten Synoviozytenpräparationen von RA-Patienten massiv gesteigert ist, verantwortlich sein könnten. Das kann durch die vorliegenden experimentellen Befunde weitgehend ausgeschlossen werden: die Produktion dieses Metaboliten nimmt bei der Differenzierung massiv ab (s. 5.2), und auch im Verhältnis zur Bildung der antiinflammatorischen Hydroxyöstrogene ergibt sich bei U-937 Makrophagen keine Steigerung gegenüber U-937 Monozyten (Abb. 14E).

6.4 Die Rolle der Catechol-O-Methyltransferase (COMT)

Die Bildung von Methoxyöstrogenen durch Monozyten bzw. Makrophagen erfordert die Aktivität einer Methyltransferase, die im Stande ist, hydroxylierte Östrogene zu methylieren. Die in dieser Arbeit identifizierten Methoxyöstrogene sind Methylierungsprodukte von Catecholöstrogenen. Deshalb lag es nahe, zu überprüfen, ob es sich bei dem verantwortlichen Enzym um die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) handelt. Die Experimente mit dem spezifischen COMT-Hemmstoff OR 486 führten zum weitgehenden Verschwinden der Methoxyöstrogene aus dem Sortiment der von den U-937 Monozyten gebildeten Östrogenmetaboliten (s. 5.3.2). Da auch die Expression von COMT-mRNA nachgewiesen werden konnte (s. 5.3.3), kann es als gesichert angesehen werden, dass tatsächlich COMT für die Bildung von Methoxyöstrogenen in diesen Zellen verantwortlich ist.

Interessanterweise war die Menge der gebildeten Methoxyöstrogene bei Monozyten und auch bei Makrophagen bei Verwendung von E2 als Substrat der Konversionsansätze etwa viermal höher als bei Verwendung von E1 als Substrat (s. Abb. 9E). Das war auffällig, da die Gesamtmenge der Östrogenmetaboliten unabhängig vom verwendeten Substrat war (s. Abb. 9F). Deshalb wurde untersucht, ob E2 die COMT-mRNA-Expression steigert. Das konnte nicht nachgewiesen werden (s. 5.3.3). In weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde zwischenzeitlich gezeigt,

dass E2 auch nicht zur gesteigerten Anhäufung von COMT-Protein führt, bzw. auch die COMT-Aktivität gegenüber anderen Substraten nicht generell steigern kann (M. Schmidt, persönliche Mitteilung). Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die bevorzugte Anhäufung von Methoxymetaboliten des E2 darauf zurückzuführen ist, dass die Catecholmetaboliten des E2 bevorzugte Substrate für die COMT darstellen.

Mit der Differenzierung der U-937 Monozyten zu Makrophagen ist ein signifikanter Rückgang der gebildeten Mengen der COMT-Produkte verbunden. Ausgehend von den nachgewiesenen Metabolitkonzentrationen kann dafür im Wesentlichen die geringere Bildung von Hydroxyöstrogenen durch die Makrophagen verantwortlich gemacht werden (vgl. Abb. 9E, 14C bzw. 14D).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Bedeutung der Synthese von Methoxyöstrogenen durch Monozyten bzw. Makrophagen nicht untersucht. Es kann aber spekuliert werden, dass die gesteigerte Hydrophobizität, die aus der Methylierung von Hydroxyöstrogenen resultiert, für eine erhöhte Verweildauer dieser Metaboliten am Ort ihrer Bildung verantwortlich sein könnte. Somit würde zumindest im Hinblick auf den lokalen Östrogenmetabolismus die COMT eine eher antiinflammatorische Rolle spielen, da Sie für die Bildung entsprechender Östrogenmetaboliten verantwortlich ist (Schmidt et al. 2009).

6.5 Die Rolle der Monozyten bzw. Makrophagen im System der Entzündungszellen bei der Rheumatischen Arthritis

6.5.1 Gemischte Synoviozytenpräparationen

Am Modell gemischter Synoviozytenpräparationen von RA- bzw. OA-Patienten wurde gezeigt, dass die Produktion des entzündungsfördernden 16 α OH-E1 in Zellen von RA Patienten etwa viermal so hoch ist, wie in Zellen von OA Patienten (Schmidt et al. 2009). Andererseits waren die Syntheseraten der anderen, antientzündlichen Östrogenmetaboliten bei Zellen beider Patientengruppen gleich. Über die Rolle der einzelnen Zelltypen, die in gemischten Synoviozytenpopulationen gefunden werden, lagen zu Beginn dieser Arbeit im Hinblick auf den Östrogenmetabolismus keine publizierten Erkenntnisse vor. Für unsere Arbeitsgruppe lag es deshalb nahe, entsprechende Modelle für die einzelnen Zelltypen näher zu untersuchen. Von

besonderem Interesse waren hierbei neben den Chondrozyten und den, vor allem bei der RA in großer Menge einwandernden Fibroblasten, Monozyten und Makrophagen.

6.5.2 Fibroblasten wirken entzündungsfördernd

Fibroblasten nehmen dabei eine entzündungsfördernde Rolle ein. Edukte für Ihren Metabolismus sind u.a. die in hohem Maße verfügbaren Prohormone Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) und E1-Sulfat. Nachdem DHEA-S über die Steroid Sulfatase (STS) zum aktiven DHEA hydrolysiert wurde (Roubertoux et al. 1994) bewirkt zum einen das von den Fibroblasten synthetisierte CYP7B die Konversion des DHEAs zum stark proinflammatorischen $7\alpha\text{OH-DHEA}$ (Dulos et al. 2005, Dulos et al. 2004). Zum anderen zeigten Fibroblasten-artige Zellen, die aus intraartikulärem Fett isoliert wurden, eine verstärkte Produktion des pro-proliferativen $16\alpha\text{OH-E1}$ (Schmidt et al. 2009). Daneben gibt es bisher keinen Anhalt für die Produktion entzündungshemmender (Steroid-)Mediatoren durch die Fibroblasten. Weiterhin entziehen die beiden genannten irreversiblen Reaktionen dem lokalen Stoffwechsel die Edukte DHEA(-S) und E1(-Sulfat), die so nicht mehr zur Produktion antientzündlicher Metaboliten zur Verfügung stehen.

Die Fibroblasten müssen demnach durchweg als lokal entzündungsfördernd und somit ungünstig für den Verlauf der RA angesehen werden.

6.5.3 Monozyten wirken entzündungshemmend

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem, Hinweise auf die Rolle der Östrogenmetabolisierung durch Monozyten und Makrophagen im funktionellen Gefüge der gemischten Synoviozyten zu gewinnen.

Die hier im Modell der U-937 Zellen gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Monozyten im Hinblick auf die gebildeten Östrogenmetaboliten rein antientzündliche Eigenschaften besitzen könnten. Sie produzieren im Vergleich zu gemischten Synoviozytenpräparationen nur wenig $16\alpha\text{OH-E1}$, häufen jedoch Hydroxy- und Methoxyöstrogene an, deren antientzündliche Wirksamkeit schon gezeigt wurde (Schmidt et al. 2009). Diese Befunde könnten vor allem deshalb von Bedeutung sein, weil im Synovialgewebe hohe Konzentrationen von Östrogenen akkumuliert werden,

die als Substrate zur Verfügung stehen (Schmidt et al. 2005a). In der gleichen Arbeit wurde auch gezeigt, dass gemischte Synoviozytenpräparationen die Androgene Testosteron und Androstendion durch die Aktivität einer 5α -Reduktase in die biologisch aktiveren 5α -Dihydroandrogene konvertieren können. Über diese Fähigkeit verfügen auch U-937 Monozyten in hohem Maße (Schmidt et al. 2006). Da Androgene auch in klinischen Studien bei RA-Patienten entzündungshemmend wirkten (Cutolo et al. 1991, Booji et al. 1996), scheinen also Monozyten ausschließlich über eine Enzymausstattung zu verfügen, die sie zur Synthese antientzündlicher Steroidmetaboliten befähigt. Das schließt sowohl die vorwiegend reduktiven 17β -HSDs mit der bevorzugten Produktion von E2 ein als auch die Tatsache, dass in Gegenwart von E2 bevorzugt Methoxyöstrogene gebildet werden.

6.5.4 Die Rolle der Makrophagen

Die Funktion der Makrophagen ist differenzierter zu betrachten. Aus dem Prohormon DHEA produzieren die Makrophagen Androgene (Schmidt et al. 2000). Schmidt et al. zeigten, dass die Makrophagen nach einem Tag aus DHEA vorwiegend 16Hydroxy-DHEA und Androstendiol produzieren; letztgenannter Metabolit zeigte sich in einem HSV-1 Modell noch stärker protektiv als DHEA selbst (Carr 1998). Nach fünftägiger Inkubation der Makrophagen lagen jedoch in größeren Mengen $3\beta,16\alpha,17\beta$ -Androstentriol, 16OH-Testosteron und E3 vor. Während $3\beta,16\alpha,17\beta$ -Androstentriol in einer Studie bei Makrophagen von Mäusen zu einem Anstieg von TNF und IL-1 führte (Padgett et al. 1997) und somit entzündungsfördernd einzuschätzen ist, variiert die E3 Wirkung konzentrationsabhängig. In geringen Dosen wirkt es antientzündlich, in hohen Konzentrationen führt E3 zu einem Anstieg von z.B. TNF und IL-6 (Correale et al. 1998, Zuckerman et al. 1996). Da sowohl bei OA- als auch bei RA-Patienten im Synovialgewebe extrem hohe E3 Konzentrationen gefunden wurden, kann man von einer rein entzündungsfördernden Rolle des E3 ausgehen (Schmidt et al. 2005a). Da die Makrophagen selbst Aromatase exprimieren (Schmidt et al. 2000), sind sie höchstwahrscheinlich auch für die lokale Konversion der entzündungshemmenden Androgene zu Östrogenen, vor allem E3, im Synovialgewebe verantwortlich (Schmidt et al. 2005a).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen die Fähigkeit zur Synthese antiinflammatorischer

Östrogenmetaboliten fast vollständig verloren geht. Daraus kann in Zusammenhang mit den vorgenannten Befunden gefolgert werden, dass die Makrophagen in Bezug zum lokalen Steroidmilieu fast ausschließlich proinflammatorische Steroide produzieren.

Die Ergebnisse der Östrogenkonversionsexperimente zeigen, dass Makrophagen über ausreichend COMT-Aktivität verfügen, um den größten Teil der noch synthetisierten Hydroxyöstrogene in Methoxyöstrogene zu konvertieren. Das wurde zwischenzeitlich auch auf der Ebene der mRNA Expression bestätigt (R. Hartung, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe der COMT deaktivieren die Makropagen weiterhin auch entzündungshemmende Catecholamine (Inoue et al. 1991).

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer RA hängt von Geschlecht und Lebensalter ab. Junge Frauen haben ein zwei- bis viermal höheres Risiko an RA zu erkranken als gleichaltrige Männer. Das Erkrankungsrisiko steigt bei beiden Geschlechtern mit dem Lebensalter an, wobei sich nach der Menopause die Inzidenz der RA bei Männern und Frauen angleicht. Diese Beobachtungen legen eine Beteiligung geschlechtsspezifischer Hormone an der Ätiopathogenese der RA nahe. So konnte gezeigt werden, dass niedrige Serumandrogenspiegel die Entstehung einer RA begünstigen und Androgentherapie die Symptome einer bestehenden RA lindert.

Bei Untersuchungen an Synovialgewebe wurde allerdings festgestellt, dass dort sowohl in Geweben von RA als auch von OA Patienten Androgene fast quantitativ zu Östrogenen konvertiert werden, was den Schluss nahe legt, dass nicht die Serumkonzentrationen dieser Steroidhormone, sondern die lokal verfügbaren Konzentrationen für das Krankheitsgeschehen relevant sind. Die Rolle von Östrogenen bei entzündlichen Erkrankungen ist nicht einheitlich pro- oder antiinflammatorisch, was auf mögliche unterschiedliche Wirkungen ihrer Metaboliten zurückgeführt wird. In unserer Arbeitsgruppe wurde unter anderem gezeigt, dass gemischte Synoviozytenpräparationen von OA bzw. RA Patienten gleichermaßen eine Reihe von antiinflammatorischen Östrogenmetaboliten bilden. RA Synoviozyten bilden jedoch ca. viermal so viel proinflammatorisches $16\alpha\text{OH-E1}$ wie OA Synoviozyten.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Monozyten alle antiinflammatorischen Östrogenmetaboliten bilden können, die auch von gemischten Synoviozytenpräparationen gebildet werden. Die Fähigkeit zur Synthese dieser Östrogenmetaboliten nimmt bei Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen stark ab. Im Hinblick auf die Schlüsselrolle von Makrophagen im Entzündungsgeschehen bei der RA erscheint es durchaus plausibel, dass die Aktivität von Enzymen, die die Synthese antiinflammatorischer Metaboliten katalysieren, herunterreguliert wird. Andererseits könnte die Bildung antiinflammatorischer Östrogenmetaboliten durch Monozyten dazu dienen, eine vorzeitige/ zufällige Aktivierung dieser Zellen zu verhindern.

Interessanterweise ließ sich die Hypothese, Monozyten bzw. vor allem Makrophagen seien für die Synthese des proinflammatorischen 16 α OH-E1 verantwortlich, nicht bestätigen. Das legt den Schluss nahe, dass hauptsächlich Fibroblasten, für die die 16 α OH-E1 Synthese schon gezeigt worden war, als Quelle dieses Metaboliten in Synovialgewebe in Frage kommen. Somit scheint zumindest in Bezug auf die entzündungsregulierende Wirkung von Östrogenmetaboliten die Rollenverteilung in Synovialzellpopulationen geklärt zu sein: Monozyten produzieren antiinflammatorische, Fibroblasten proinflammatorische Metaboliten.

Für gemischte Synoviozytenpräparationen war bekannt, dass sowohl die Catecholöstrogene als auch ihre Methylierungsprodukte, die Methoxyöstrogene, hemmend auf die Freisetzung von TNF und anderen Zytokinen wirken. Daher kann nach dem jetzigen Kenntnisstand keine fundierte Aussage zur biologischen Bedeutung der COMT-vermittelten Synthese von Methoxyöstrogenen durch Monozyten bzw. Makrophagen gemacht werden. Im Hinblick darauf wäre es erforderlich, für die RA relevante Zelltypen und Mechanismen zu identifizieren, die in unterschiedlicher Weise von Hydroxy- bzw. Methoxyöstrogenen beeinflusst werden.

8. LITERATUR UND QUELLENVERZEICHNIS

- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*, 69 (9):1580-1588.
- Bajaj M, Dubey AP, Nagpal J, Singh PK, Sachdev HP. 2005. Short-term effect of oil supplementation of complementary food on total ad libitum consumption in 6- to 10-month-old breastfed Indian infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 41 (1):61-65.
- Bajocchi G, La Corte R, Locaputo A, Govoni M, Trotta F. 2000. Elderly onset rheumatoid arthritis: clinical aspects. *Clin Exp Rheumatol*, 18 (4 Suppl 20):S49-50.
- Bekhereva EP. 1973. [Role of various portions of the amygdaloid complex in the action of various cholinolytics and estrogens on the gonadotropic function of the hypophysis]. *Probl Endokrinol (Mosk)*, 19 (5):43-47.
- Boles BK, Ritzenthaler J, Birkenmeier T, Roman J. 2000. Phorbol ester-induced U-937 differentiation: effects on integrin alpha(5) gene transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278 (4):L703-712.
- Booji A, Biewenga-Booji CM, Huber-Bruning O, Cornelis C, Jacobs JW, Bijlsma JW. 1996. Androgens as adjuvant treatment in postmenopausal female patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 55 (11):811-815.
- Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. 2004. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum*, 50 (11):3408-3417.
- Cabanas C, Sanchez-Madrid F, Aller P, Yague E, Bernabeu C. 1990. Phorbol esters induce differentiation of U-937 human promonocytic cells in the absence of LFA-1/ICAM-1-mediated intercellular adhesion. *Eur J Biochem*, 191 (3):599-604.
- Capellino S, Riepl B, Rauch L, Angele P, Cutolo M, Straub RH. 2007. Quantitative determination of steroid hormone receptor positive cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: is there a link to inflammation? *Ann Rheum Dis*, 66 (1):53-58.
- Carr DJ. 1998. Increased levels of IFN-gamma in the trigeminal ganglion correlate with protection against HSV-1-induced encephalitis following subcutaneous administration with androstenediol. *J Neuroimmunol*, 89 (1-2):160-167.
- Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M, Cutolo M, Straub RH. 2003. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 30 (12):2597-2605.
- Correale J, Arias M, Gilmore W. 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*, 161 (7):3365-3374.

- Cutolo M, Wilder RL. 2000. Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*, 26 (4):825-839.
- Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Intra E, Accardo S. 1991. Androgen replacement therapy in male patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 34 (1):1-5.
- Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Ghiorzo P, Sulli A, Villaggio B. 2005. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther*, 7 (5):R1124-1132.
- Cutolo M, Accardo S, Villaggio B, Barone A, Sulli A, Balleari E, Bason C, Felli L, Granata OM, Amodio R, Castagnetta L. 1995. Androgen metabolism and inhibition of interleukin-1 synthesis in primary cultured human synovial macrophages. *Mediators Inflamm*, 4 (2):138-143.
- Da Silva JA, Spector TD. 1992. The role of pregnancy in the course and aetiology of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 11 (2):189-194.
- Danenberg HD, Alpert G, Lustig S, Ben-Nathan D. 1992. Dehydroepiandrosterone protects mice from endotoxin toxicity and reduces tumor necrosis factor production. *Antimicrob Agents Chemother*, 36 (10):2275-2279.
- Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. 1993. Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J Immunol*, 150 (12):5219-5230.
- Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Rosselli M, Barchiesi F, Krust A, Keller H, Zacharia LC, Imthurn B. 2005. Cytochromes 1A1/1B1- and catechol-O-methyltransferase-derived metabolites mediate estradiol-induced antimitogenesis in human cardiac fibroblast. *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (1):247-255.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350 (25):2572-2581.
- Feldmann M, Maini RN. 2003. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med*, 9 (10):1245-1250.
- Fiorito S, Magrini L, Adrey J, Mailhe D, Brouty-Boye D. 2005. Inflammatory status and cartilage regenerative potential of synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and chondropathy. *Rheumatology (Oxford)*, 44 (2):164-171.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423 (6937):356-361.
- FitzGerald GA. 2003. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (11):879-890.
- Fleischmann RM, Tesser J, Schiff MH, Schechtman J, Burmester GR, Bennett R, Modafferi D, Zhou L, Bell D, Appleton B. 2006. Safety of extended treatment with anakinra in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65 (8):1006-1012.
- Gold SM, Voskuhl RR. 2009. Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis. *Prog Brain Res*, 175:239-251.
- Harris P, Ralph P. 1985. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol*, 37 (4):407-422.
- Hattori T, Pack M, Bougnoux P, Chang ZL, Hoffman T. 1983. Interferon-induced differentiation of U937 cells. Comparison with other agents that promote

- differentiation of human myeloid or monocytelike cell lines. *J Clin Invest*, 72 (1):237-244.
- Hennebold JD, Daynes RA. 1994. Regulation of macrophage dehydroepiandrosterone sulfate metabolism by inflammatory cytokines. *Endocrinology*, 135 (1):67-75.
- Hu SK, Mitcho YL, Rath NC. 1988. Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol*, 10 (3):247-252.
- Inoue K, Nishino T, Creveling CR. 1991. Immunocytochemical evidence for the site of O-methylation in rat dental pulp. *J Dent Res*, 70 (6):966-969.
- Isomaki H. 1992. Long-term outcome of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl*, 95:3-8.
- Iwamoto N, Kawakami A, Arima K, Tamai M, Nakamura H, Kawashiri SY, Kita J, Okada A, Koga T, Kamachi M, Yamasaki S, Ichinose K, Ida H, Origuchi T, Eguchi K. 2010. Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) -77 promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*.
- Jakob F, Homann D, Adamski J. 1995. Expression and regulation of aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 4 in human THP 1 leukemia cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 55 (5-6):555-563.
- Jakob F, Siggelkow H, Homann D, Kohrle J, Adamski J, Schutze N. 1997. Local estradiol metabolism in osteoblast- and osteoclast-like cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61 (3-6):167-174.
- Jang BC, Jung TY, Paik JH, Kwon YK, Shin SW, Kim SP, Ha JS, Suh MH, Suh SI. 2005. Tetradecanoyl phorbol acetate induces expression of Toll-like receptor 2 in U937 cells: involvement of PKC, ERK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*, 328 (1):70-77.
- Jenei-Lanzl Z, Straub RH, Dienstknecht T, Huber M, Hager M, Grassel S, Kujat R, Angele MK, Nerlich M, Angele P. 2010. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum*, 62 (4):1088-1096.
- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. 1996. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*, 106 (2):410-415.
- Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. 1997. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40 (9):1703-1711.
- Kay J, Westhovens R. 2009. Methotrexate: the gold standard without standardisation. *Ann Rheum Dis*, 68 (7):1081-1082.
- Komi J, Mottonen M, Luukkainen R, Lassila O. 2001. Non-steroidal anti-oestrogens inhibit the differentiation of synovial macrophages into dendritic cells. *Rheumatology (Oxford)*, 40 (2):185-191.
- Lee AJ, Conney AH, Zhu BT. 2003. Human cytochrome P450 3A7 has a distinct high catalytic activity for the 16alpha-hydroxylation of estrone but not 17beta-estradiol. *Cancer Res*, 63 (19):6532-6536.
- Lee AJ, Kosh JW, Conney AH, Zhu BT. 2001. Characterization of the NADPH-dependent metabolism of 17beta-estradiol to multiple metabolites by human liver microsomes and selectively expressed human cytochrome P450 3A4 and 3A5. *J Pharmacol Exp Ther*, 298 (2):420-432.

- Li ZG, Danis VA, Brooks PM. 1993. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol*, 11 (2):157-162.
- Liehr JG. 1997. Hormone-associated cancer: mechanistic similarities between human breast cancer and estrogen-induced kidney carcinogenesis in hamsters. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 3:565-569.
- Lundgren B, Bottiger D, Ljungdahl-Stahle E, Norrby E, Stahle L, Wahren B, Oberg B. 1991. Antiviral effects of 3'-fluorothymidine and 3'-azidothymidine in cynomolgus monkeys infected with simian immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 4 (5):489-498.
- Masi AT. 1995. Sex hormones and rheumatoid arthritis: cause or effect relationships in a complex pathophysiology? *Clin Exp Rheumatol*, 13 (2):227-240.
- Miller WL. 2008. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*, 13:1-18.
- Mindnich R, Moller G, Adamski J. 2004. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 218 (1-2):7-20.
- Minta JO, Pambrun L. 1985. In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with phorbol myristate acetate. *Am J Pathol*, 119 (1):111-126.
- Morgan AW, Robinson JI, Conaghan PG, Martin SG, Hensor EM, Morgan MD, Steiner L, Erlich HA, Gooi HC, Barton A, Worthington J, Emery P. 2010. Evaluation of the rheumatoid arthritis susceptibility loci HLA-DRB1, PTPN22, OLIG3/TNFAIP3, STAT4 and TRAF1/C5 in an inception cohort. *Arthritis Res Ther*, 12 (2):R57.
- Nilsson K, Sundstrom C. 1974. Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma. *Int J Cancer*, 13 (6):808-823.
- Oberg F, Larsson LG, Anton R, Nilsson K. 1991. Interferon gamma abrogates the differentiation block in v-myc-expressing U-937 monoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (13):5567-5571.
- Oberg K, Eriksson B. 1991. The role of interferons in the management of carcinoid tumors. *Acta Oncol*, 30 (4):519-522.
- Padgett DA, Loria RM, Sheridan JF. 1997. Endocrine regulation of the immune response to influenza virus infection with a metabolite of DHEA-androstenediol. *J Neuroimmunol*, 78 (1-2):203-211.
- Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK. 1984. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum*, 27 (8):864-872.
- Plum SM, Park EJ, Strawn SJ, Moore EG, Sidor CF, Fogler WE. 2009. Disease modifying and antiangiogenic activity of 2-methoxyestradiol in a murine model of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*, 10:46.
- Polan ML, Kuo A, Loukides J, Bottomly K. 1990. Cultured human luteal peripheral monocytes secrete increased levels of interleukin-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 70 (2):480-484.
- Pucillo CE, Colombatti A, Vitale M, Salzano S, Rossi G, Formisano S. 1993. Interactions of promonocytic U937 cells with proteins of the extracellular matrix. *Immunology*, 80 (2):248-252.
- Rainey WE, Nakamura Y. 2008. Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108 (3-5):281-286.
- Rossano MG, Schott HC, 3rd, Kaneene JB, Murphy AJ, Kruttlin EA, Hines MT, Sellon DC, Patterson JS, Elsheikha HM, Dubey JP, Mansfield LS. 2005. Effect of daily administration of pyrantel tartrate in preventing infection in horses

- experimentally challenged with *Sarcocystis neurona*. *Am J Vet Res*, 66 (5):846-852.
- Roubertoux PL, Degrelle H, Maxson SC, Phillips J, Tordjman S, Moutier R, Dupertuis-Hass MC. 1994. Alleles of the microsomal steroid sulfatase gene (Sts) in the pseudoautosomal region of the heterosomes of the mouse. *C R Acad Sci III*, 317 (6):523-527.
- Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 301 (2):418-426.
- Schmidt M, Kreutz M, Löffler G, Scholmerich J, Straub RH. 2000. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J Endocrinol*, 164 (2):161-169.
- Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Scholmerich J, Straub RH. 2005a. Androgen conversion in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synoviocytes--androstenedione and testosterone inhibit estrogen formation and favor production of more potent 5alpha-reduced androgens. *Arthritis Res Ther*, 7 (5):R938-948.
- Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Scholmerich J, Straub RH. 2005b. Reduced capacity for the reactivation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells: possible role of the sympathetic nervous system? *Arthritis Rheum*, 52 (6):1711-1720.
- Schmidt M, Naumann H, Weidler C, Schellenberg M, Anders S, Straub RH. 2006. Inflammation and sex hormone metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 1069:236-246.
- Schmidt M, Hartung R, Capellino S, Cutolo M, Pfeifer-Leeg A, Straub RH. 2009. Estrone/17beta-estradiol conversion to, and tumor necrosis factor inhibition by, estrogen metabolites in synovial cells of patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 60 (10):2913-2922.
- Schneider S, Schmitt G, Richter W. 2006. Prevalence and correlates of inflammatory arthritis in Germany: data from the First National Health Survey. *Rheumatol Int*, 27 (1):29-38.
- Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ. 1987. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet*, 1 (8542):1108-1111.
- Scott SD. 1998. Rituximab: a new therapeutic monoclonal antibody for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Pract*, 6 (3):195-197.
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *J Plant Physiol*, 162 (8):854-864.
- Silman AJ, Pearson JE. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3:S265-272.
- Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M. 1997. Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol*, 24 (2):365-371.
- So A, De Smedt T, Revaz S, Tschopp J. 2007. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*, 9 (2):R28.
- Song J, Dubey B, Jang YC, Townsend T, Solo-Gabriele H. 2006. Implication of chromium speciation on disposal of discarded CCA-treated wood. *J Hazard Mater*, 128 (2-3):280-288.
- Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA. 2006. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 54 (8):2481-2487.

- Straub RH. 2007. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*, 28 (5):521-574.
- Straub RH, Cutolo M. 2001. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum*, 44 (3):493-507.
- Straub RH, Konecna L, Hrach S, Rothe G, Kreutz M, Scholmerich J, Falk W, Lang B. 1998. Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Clin Endocrinol Metab*, 83 (6):2012-2017.
- Svensson B, Boonen A, Albertsson K, van der Heijde D, Keller C, Hafstrom I. 2005. Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial. *Arthritis Rheum*, 52 (11):3360-3370.
- Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, Scott D, Silman A. 2002. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford)*, 41 (7):793-800.
- Toyoda H, Takei S, Formby B. 1996. Effect of 5-alpha dihydrotestosterone on T-cell proliferation of the female nonobese diabetic mouse. *Proc Soc Exp Biol Med*, 213 (3):287-293.
- Weidler C, Struharova S, Schmidt M, Ugele B, Scholmerich J, Straub RH. 2005. Tumor necrosis factor inhibits conversion of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to DHEA in rheumatoid arthritis synovial cells: a prerequisite for local androgen deficiency. *Arthritis Rheum*, 52 (6):1721-1729.
- Yen PH, Allen E, Marsh B, Mohandas T, Wang N, Taggart RT, Shapiro LJ. 1987. Cloning and expression of steroid sulfatase cDNA and the frequent occurrence of deletions in STS deficiency: implications for X-Y interchange. *Cell*, 49 (4):443-454.
- Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR. 2000. HLA class II association with rheumatoid arthritis: facts and interpretations. *Hum Immunol*, 61 (12):1254-1261.
- Zhu BT, Conney AH. 1998. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 19 (1):1-27.
- Zink A, Listing J, Niewerth M, Zeidler H. 2001. The national database of the German Collaborative Arthritis Centres: II. Treatment of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 60 (3):207-213.
- Zuckerman SH, Ahmari SE, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL. 1996. Estriol: a potent regulator of TNF and IL-6 expression in a murine model of endotoxemia. *Inflammation*, 20 (6):581-597.

9. ANHANG

9.1 Danksagung

Ich danke an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. habil. Reinhard Klinger für die wohlwollende und hilfreiche Förderung als betreuender Hochschullehrer.

Insbesondere möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Martin Schmidt für eine umfassende und kollegiale Betreuung danken, weiterhin auch den Mitarbeiterinnen des Institutes für Biochemie II des Universitätsklinikums Jena, Frau Gabriele Eiselt, Antje Pfeifer-Leeg und Regina Hartung für die freundliche Unterstützung.

Auch seien an dieser Stelle meine Familie und Freunde erwähnt, die mir immer wieder neue Kraft und Zuversicht geschenkt haben.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, *Volker Fritzs*ch, geboren am 30.11.1980 in Werdau, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. rer. nat. Martin Schmidt.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12.03.2012

Volker Fritzs

ch, Verfasser